UNTERSUCHUNGEN ZUR EISENVERSORGUNG VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Bernhard Ohme
aus Böblingen

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0046

UNTERSUCHUNGEN ZUR EISENVERSORGUNG VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Bernhard Ohme
aus Böblingen

1986

Tag der mündlichen Prüfung:	*09.06.1986*
Dekan:	*Professor Dr. R. Hampp*
1. Berichterstatter:	*Professor Dr V. Braun*
2. Berichterstatter:	*Professor Dr. K. Hantke*

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. V.Braun am Lehrstuhl Mikrobiologie II des Institutes für Biologie II der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof.Dr. V.Braun danke ich für die Überlassung des Themas und für seine ständige und freundliche Diskussionsbereitschaft.

Weiterem Dank bin ich Herrn Priv.Doz.Dr. K.Hantke verpflichtet, der mir bei praktischen Fragen immer hilfreich zur Seite stand.

Herrn Prof.Dr. G.Winkelmann danke ich für die Diskussion bei den Transportstudien.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei H.Wolff bedanken, die mich auch in schwierigen Phasen der Doktorarbeit immer wieder aufgemuntert hat, und so eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen hat.

Herrn Wolfgang Huhn vom Lehrstuhl II danke ich für die ständige Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse.

Großen Dankbarkeit bringe ich meinem Vater entgegen, der es mir ermöglichte, diese Arbeit auf einem IBM-PC mit dem Textverarbeitungssystem SCRIPT der Firma IBM Deutschland GmbH anzufertigen.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Alb	Albomycin
BiC.	Bicarbonat
BPS	Bethophenanthrolindisulfonat
cpm	Counts per minute
Desf.	Desferrioxamin B
DFF	Desferri-Ferrichrom
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DNP	Dinitrophenol
FOX B	Ferrioxamin B
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDDA	Ethylendiamindiorthohydroxyphenylacetat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FC	Ferrichrom
FOX	Ferrioxamin B
MNNG	N-Methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidin
NB	Nutrient Broth
NBD	Nutient Broth mit Dipyridyl
NBE	Nutient Broth mit EDDA
NTA	Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
RA	Rhodutorulasäure
RT	Raumtemperatur
ON	Über Nacht
WH	Wachstumshemmung
WV	Wachstumsverhalten

Inhaltsverzeichnis:

KAPITEL 1. EINLEITUNG....1

1.1 Bedeutung des Eisens in biologischen Prozessen....1
1.2 Mechanismen zur Eisenversorgung....1
1.3 Eisenversorgung von E.coli....2
1.4 Eisen und Pathogenität....3
1.5 Eisenversorgung bei S.Aureus....6
1.6 Ziel der Arbeit....8

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN....9

2.1 Chemikalien....9
2.2 Lösungen und Medien....10
2.3 Bakterienstämme....11
2.4 Reinigung von EDDA....12
2.5 Eisenbestimmung mit Ferrozin....12
2.6 Isolierung des Pigments von S.aureus....13
2.7 Wachstumsbedingungen....13
2.7.1 Wachstumsbedingungen im Vollmedium....13
2.7.2 Wachstum in NBE, bzw NBD Medium....13
2.7.3 Wachstum im Serum....14
2.7.4 Wachstum in NB-Transferrin-Medium....14
2.7.5 Beladung des Transferrins....15
2.7.6 Verwertung des Transferrins....15
2.7.7 Bestimmung von Hydroxamaten....15
2.7.8 Bestimmung von Phenolat (5)....16
2.7.9 Allgemeiner Test auf Chelatoren....16
2.7.10 Wachstumsförderungen durch Oberstände....16
2.7.11 Wachstumsförderung durch Zellen....16
2.7.12 Wachstumshemmung....16
2.7.12.1 Mit Desferrioxamin B und Ascorbat....17
2.7.12.2 Mit Conalbumin, Citrat und Bicarbonat....17
2.7.12.3 Mit Desferrioxamin B bei OH 10....17
2.8 Plattendiffusionssystem zum Nachweis von Siderophoren....17
2.9 Mutagenesen....18
2.9.1 MNNG Mutagenesen....18
2.9.2 MNNG Mutagenese mit Streptonigrin Anreicherung....18
2.9.3 Mutation mit Selektion auf NBD Platten....18
2.9.4 Mutation mit Ampicillin Anreicherung....19
2.9.5 Test auf Eisenmangelmutanten....19
2.10 Isolierung Albomycin resistenter Mutanten....19
2.11 Plattendiffusionstests zur Wachstumsstimulierung mit Hydroxamaten....19
2.12 Test auf Reduktase....20
2.13 Eichkurve zur Trockengewichtsbestimmung....21
2.14 Beladung des DFF mit Markiertem Eisen....21
2.15 Transportstudien....21
2.15.1 Ferrichromtransport....21
2.15.2 Berechnung der Transportrate....22
2.15.3 Herstellung 1 mM Hydroxamatstammlösungen....23
2.15.4 Energieabhängiger Ferrichrom Transport....23
2.15.5 Zeitabhängiger FC-Transport....23
2.15.6 Fe-Transferrin Transport....23
2.15.7 Sättigungskinetik des Ferrichromtransports....24
2.15.8 Km-Wert Bestimmung....24

2.15.9 Hemmung der FC Aufnahme....24
2.15.10 Pulse-Chase mit kaltem FC....25
2.15.11 Fe-Citrat Transport....25
2.15.12 RA- und Aerobactin-Transport....25
2.15.13 Coprogen Transport....25

KAPITEL 3. ERGEBNISSE....26

3.1 Wachstum in NBD und NBE....26
3.2 Mutagenesen....29
3.2.1 Isolierung von Alb-resistener Mutanten....29
3.3 MNNG Mutagenesen....31
3.3.1 Mit Streptonigrin Anreicherung....31
3.3.2 Mit Selektion auf NBE (0,5 mM)....31
3.3.3 Mit Ampicillin Anreicherung....32
3.4 Probleme mit Mutanten....32
3.4.1 Physiologische Merkmale der MNNG Mutanten....32
3.4.2 Plattendiffusionstests mit Topagar....35
3.5 Wachstum unter Eisenmangel....36
3.6 Nachweis von Siderophoren....41
3.7 Reduktaseaktivität....44
3.8 Wachstumsförderung....45
3.8.1 Wachstumsförderung durch Kulturüberstände....45
3.8.2 Wachstumsförderung durch Zellen....45
3.9 Plattendiffusionstests....48
3.10 Transportstudien....49
3.10.1 Zeitabhängiger FC Transport....49
3.10.2 Energieabhängiger FC Transport....51
3.10.3 Ferrichrom Transport bei OH 5, OH 10 und OH 15....56
3.10.4 Transferrin Transport....57
3.10.5 Km-Wert Bestimmung....58
3.10.6 Hemmung des FC Transports....61
3.10.7 Pulse chase Experiment mit FC....63
3.10.8 Fe-Citrat Transport....65
3.10.9 Aerobactin und RA Transport....66
3.10.10 ^{14}C-Coprogen Transport....67

KAPITEL 4. DISKUSSION....68

4.1 Eisenmangel und Mutagenesen....68
4.2 Siderophorproduktion und Wachstumsförderung....69
4.3 Plattendiffusionstests....70
4.4 Transportversuche....70

KAPITEL 5. ZUSAMMENFASSUNG....72

KAPITEL 6. LITERATUR....74

KAPITEL 1. EINLEITUNG

1.1 BEDEUTUNG DES EISENS IN BIOLOGISCHEN PROZESSEN.

Man findet Eisen unter anderem in den Katalasen, Peroxidasen und als Eisenspeicher in der menschlichen Zelle in Form des Ferritins. Je nach Umgebung ist das Redoxpotential des Eisens unterschiedlich, und diese Eigenschaft ermöglicht es, daß dieses Elememt eine so große Rolle im Stoffwechsel spielt (47,9). Der Redoxbereich des Eisens reicht von +300 mV bei der Cytochrom a-Familie bis zu -500 mV bei einigen Eisen-Schwefel-Proteinen.

Man findet das Eisen in nahezu allen aerob oder fakultativ anaeroben Organismen, die Cytochrome besitzen, mit Ausnahme der Milchsäurebakterien (3). Um das Eisen nutzen zu können, müssen die Organismen jedoch eine große Schwierigkeit überwinden. Obwohl das Eisen eines der 4 häufigsten Elemente der Erde darstellt, ist es unter physiologischen, d.h. oxidativen Bedingungen und neutralem pH, praktisch unlöslich. Es liegt dann in der Eisen(III)-Form vor und neigt stark zur Bildung eines Eisen(III)-Aquohydrokomplexes. Dieser hat bei 25°C ein Löslichkeitsprodukt von 10^{-36} bis 10^{-38} (57). Das bedeutet, daß die Konzentration an freien Fe^{3+}-Ionen extrem niedrig und für ein Zellwachstum nicht ausreichend ist (80). So benötigen Mikroorganismen 0,1 - 1 µM Eisen zum Wachstum (9), dem steht aber ein Angebot an freiem Eisen von ca. 10^{-12} µM entgegen.

Dennoch gelingt es den Mikroorganismen, sich ausreichend mit Eisen zu versorgen. Eine Zelle enthält, je nach den physiologischen Bedingungen, 10^{5} bis 10^{8} Eisenatome (3).

1.2 MECHANISMEN ZUR EISENVERSORGUNG

Aerob lebende Organismen haben einen Mechanismus entwickelt, der das unlösliche Eisen mobilisiert und der Zelle zugänglich macht. Dies geschieht in der Regel durch die Synthese hochaffiner Eisenkomplexbildner, sogenannter Siderophore. Diese Moleküle werden ins Medium ausgeschieden, führen das Eisen in eine lösliche Form über, welches dann von der Zelle aufgenommen, reduziert, und in Biomoleküle eingebaut werden kann. Die Synthese des Liganden ist Eisen-reguliert, d.h. wenn der Eisengehalt der Zelle einen gewissen Grenzwert unterschritten hat, wird der Chelator sythetisiert und ausgeschieden.

Im Laufe der Evolution haben sich 2 chemisch unterschiedliche Grundstrukturen etabliert: das sind zum einen die Hydroxamsäuren und zum anderen die Phenolsäuren, bzw. deren Derivate. Da die Fähigkeit, einen Siderophor zu synthetisieren, einen Pathogenitätsfaktor darstellt (s.u.) wurde in der letzten Zeit verstärkt nach Siderophoren geforscht, aber auch nach anderen Pathogenitätsfaktoren, die durch den Eisengehalt der Zelle reguliert werden. Phenolate wurden hauptsächlich bei E.coli , Aerobacter aerogenes und Salmonella gefunden (49,23,56), aber auch bei Klebsiella pneumoniae (53), Shigella flexneri (52) , Azotobacter vinelandii (16), Agrobacterium tumefaciens (50) und Rhizobium (44). Die Hydroxamate kommen häufiger vor als die Phenolate und werden vor allem von Gram negativen Bakterien (19,33,34,51,52,54), Streptomyceten und Pilzen ausgeschieden; man findet sie aber auch bei Gram positiven Vertretern wie z.B. Arthrobacter (46) oder Micrococcus (72). Neben den Mikroorganismen, die nachweislich Siderophore produzieren, gibt es aber auch Vertreter, bei denen die Autoren unterschiedlicher Meinung über das Vorkommen solcher Chelatoren sind. Als Beispiel sind die Neisserien zu nennen (48,87,88,89). Bei einigen Mikroorganismen konnten bisher noch kein Siderophor nachgewiesen werden, z.B. Legionella (58).

1.3 EISENVERSORGUNG VON E.COLI

Der am besten untersuchte Mikroorganismus ist E.coli . Bei ihm findet man neben einem relativ niederaffinen Eisenaufnahmemechanismus 5 hochaffine Aufnahmesysteme, die durch Eisenmangel induziert werden. Diese 5 Transportsysteme benötigen jeweils in der äußeren Membran ein hochspezifisches Rezeptorprotein.

Die meisten Enterobacteriaceen produzieren unter Eisenmangel das Siderophor Enterochelin, ein Molekül, welches zur Phenolatfamilie gehört. Entrochelin ist ein cyclisches Trimeres des 2,3-Dihydroxybenzoylserins mit der höchsten Affinität zum Eisen, die bisher bekannt ist. Es wird in mehreren Schritten synthetisiert und dann ins Medium abgegeben (38,84,90). Für die Aufnahme des Ligand-Eisen(III)-Komplexes dienen das FepA Protein in der äußeren Membran (26) und das FepB Genprodukt in der Cytoplasmamembran (43,55,79,86).

Ein weiteres, hochaffines Eisentransportsystem ist das Ferridicitrat Transportsystem (22). Wie im Falle des Enterochelins wird ein Rezeptorprotein in der äußeren Membran benötigt, das FecA Protein (76), und in der Cytoplasmamembran das FecB Genprodukt.

Bei den restlichen Aufnahmesystemen werden Siderophore des Hydroxamattyps in die Zelle transportiert. Diesen ist die Permeation durch die Cytoplasmamembran gemeinsam, für die

die Gene fhuBCD notwendig sind (20,32,68,78,85,).

Ferrrichrom, das durch den Pilz Ustilago sphaerogena synthetisiert wird, gelangt über den FhuA Rezeptor in den periplasmatischen Raum. Denselben Rezeptor benutzt das dem Ferrichrom strukturanaloge Antibioticum Albomycin; aber auch die Phagen T1, T5, Ø80 und das Colicin M benutzen diesen Rezeptor (11,32,78,79). Ferrichrom wird bei der Aufnahme acetyliert und dann in das Medium wieder ausgeschieden (68). In dieser Form kann es nicht wieder aufgenommen werden.

Coprogen, ein ebenfalls von Pilzen synthetisierter. Eisenkomplexbildner benötigt das FhuE Genprodukt (28).

Das letzte, bisher bekannte Aufnahmesystem, ist das Aerobactinsystem. Dazu benötigt E.coli das Iut-Protein in der äußeren Membran. Das Aerobactin wird von Enterobacteriaceen synthetisiert und bei vielen klinischen Isolaten von E.coli gefunden (8). Die Gene für die Biosynthese und die Aufnahme des Aerobactins liegen auf konjugativen Plasmiden. Bei E.coli liegen diese Gene auf den ColV Plasmiden (71,81,82). Sie werden aber auch chromosomal codiert (10).

Alle Aufnahmesysteme benötigen weiterhin die Gene tonB und exbB (21,30).Das Gen fur codiert für ein Repressorprotein, das bei hohen Eisenkonzentrationen synthetisiert wird und die Gene der Eisenversorgung abschaltet. benötigt. Es stellt somit einen übergeordneten Regulationsmechanismus dar (27, 29).

1.4 EISEN UND PATHOGENITäT

Schon längere Zeit beschäftigten sich Arbeitsgruppen mit der Frage, weshalb einige Mikroorganismen im Serum überleben, andere nicht. Für diese Untersuchungen wurden allein von A.Schneider 300.000 Mäuse benötigt. Er impfte den Tieren virulente und avirulente Stämme von Salmonella ein und zeigte, daß Mäuse überlebten, die vollwertige Kost bekamen. Tiere, die mit einer Diät gefüttert wurden, starben an der Infektion. Schneider vermutete, daß es in der Nahrung einen Faktor gibt, der die Resistenz der Tiere gegenüber den Salmonellen bedingt. Er nannte diesen Faktor Salmonella resistance factor (SRF), später "Pacifarin". Er erkannte, daß auch getrocknetes Hühnereiweiß eine starke Pacifarinaktivität aufwies. Allerdings konnte der Faktor zu dieser Zeit noch nicht näher identifiziert werden (77). Später fand Schade (63), daß der Faktor im Hühnereiweiß das Ovotransferrin ist. Den Salmonellen gelang es deshalb nicht, sich zu vermehren. Die Diät, die die Mäuse bekamen, enthielt relativ wenig Eisen. Dadurch wurde die Produktion des Siderophors der Salmonellen erhöht. Diese vermehrten sich aus diesem Grund schneller.

1944 zeigte Schade, daß das Eisen eine zentrale Rolle beim Wachstum mit Ovotransferrin spielt. Er untersuchte verschieden Mikroorganismen auf Wachstum mit Hühnereiweiß. So konnte er erstmals zeigen, daß der Faktor, den Schneider u.a. im Hühnereiweiß vermutete, ein Eisenbindeprotein ist, nämlich das Ovotransferrin (63). 2 Jahre später beschieb er eine eisenbindende Komponente im menschlichen Plasma, die später als das Transferrin bekannt wurde (64). 1963 beschrieb Schade die grundsätzliche Bedeutung des Serumeisens für das Wachstums von S.aureus und anderen Mikroorganismen (65). Er fand einen Zusammenhang zwischen dem Eisengehalt des Serums und dem Wachstum einiger Mikroorganismen. Durch Zugabe von Eisen wuchsen Zellen, die sich im Serum sonst nicht vermehren konnten. So zeigte er, daß die Pathogenität entscheidend davon abhängt, ob sich ein Mikroorganismus im Serum mit Eisen versorgen kann oder nicht. Er stellte fest, daß sich S.aureus auch ohne Zugabe von Eisen im Serum vermehrt. Der Faktor im Serum, der die Vermehrung einiger Mikroorganismen verhindert, ist das Transferrin, ein Eisenbindeprotein. Normalerweise ist das Transferrin im Serum nur zu 30% mit Eisen beladen. Durch Zugabe von Eisen wird der Grad der Sättigung erhöht. Da die Bindung des Eisens jedoch nicht kovalent ist, dissoziieren mehr Eisen Ionen ins Serum und können so von Mikroorganismen verwertet werden, die sonst im Serum nicht wachsen können.

Neben der Fähigkeit sich an Schleimhäute anzuheften, Hämolysine oder Resistenzfaktoren gegen die bakterícide Wirkung des Serums zu entwickeln, ist die Vermehrung eines pathogenen Keims die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Invasion des Wirts. Diese Vermehrung wiederum ist abhängig von der Verfügbarkeit des Eisens (24,25).

Die Bakterien müssen viele Abwehrmechanismen des Körpers überwinden, bevor sie eine Krankheit auslösen können. Abwehrmechanismen sind zum Beispiel Schleimabsonderung, niedriger pH, Lysozymeinwirkung, Phagocytose, zelluläre und humorale Antwort des Immunsystems auf den Eindringling und schließlich das Komplementsystem.

Obwohl die Eisenkonzentration im Körper ca. 20 µM (25) beträgt,und so durchaus im Bereich dessen liegt, was Mikroorganismen zum Wachsen benötigen, ist das Eisen größtenteils an Trägerproteine gebunden, so daß die Konzentration an freiem Eisen(III)-Ionen im Serum nur 10^{-18}µM beträgt.

Die Eisenbindeproteine der Vertebraten sind das Lactoferrin und das Transferrin. Die Assoziationskonstanten betragen 10^{38} beim Lactoferrin (2) bzw. 10^{36} beim Transferrin (1). Beide Proteine binden mit Bicarbonat je 2 Ionen Fe^{3+} pro Molekül Eisenbindeprotein. Transferrin ist im Körper nur zu 30 % mit Eisen gesättigt; wohingegen Lactoferrin nur einen Sättigungsgrad von 5 % erreicht.

Das Transferrin findet man vor allem im Blutserum. Zusammen mit den Antikörpern wirkt das Transferrin im Serum bakterizid und stellt so einen guten Schutz vor

Das Lactoferrin wird in den Lysosomen gefunden und nach dem Eindringlingen dar (4).

Das Lactoferrin wird in den Lysosomen gefunden und nach dem Beginn der Phagocytose ausgeschieden, um so das Wachstum der Mikroorganismen zu unterbinden (13). Lactoferrin findet man außerdem noch in der Muttermilch, in der Kuhmilch, in sekretorischen Drüsen, verschiedenen Gewebszellen, Nasen- und Bronchialschleimhäuten, in der Tränenflüssigkeit, im Speichel, Darm, Harn und in der Samenflüssigkeit (42).

Während einer Infektion werden beide Eisenbindeproteine vermehrt produziert. Lactoferrin wird vermutlich an den entzündeten Bereichen ausgeschieden (31). Ebenso wird die Eisenaufnahme des Darms herabgesenkt. Die Eisenkonzentration im Plasma wird erniedrigt, gleichzeitig wird der Ferritinspeicher der Zellen erhöht. Durch die Erhöhung der Temperatur, also bei Fieber, wird die Eisenaufnahme der Mikroorganismen gesenkt (18,36). Die Zugabe von Eisen verhindert zum Teil diese Abwehrmechanismen und erhöht somit die Gefahr der Infektion (14,35).

Dennoch gelingt es pathogenen Keimen, in den Körper einzudringen und sich dort zu vermehren. Sicherlich ist von entscheidender Bedeutung die Fähigkeit, aus dem Transferrin bzw. dem Lactoferrin das Eisen mittels eigener Chelatoren herauszulösen oder aber die Fähigkeit, das Transferrin direkt zu verwerten, wie es bei den Neisserien der Fall zu sein scheint.

Bei Menschen, deren Eisenresorbtion vermindert ist, muß das Eisen auf anderem Wege aus dem Körper geschafft werden. Dies geschieht häufig mit dem bisher einzigen in der Medizin angewandten Siderophor, dem Desferrioxamin B, einem Chelatbildner, der unter anderem aus Streptomyces pilosus gewonnen wird. Desferrioxamin B hat eine ähnliche Komplexkonstante wie das Transferrin und wird über die Niere ausgeschieden. Der Vorteil dieses Chelators ist, daß er von sehr wenigen Mikroorganismen aufgenommen wird und zu deren Eisenversorgung dienen kann. Problematisch ist die Applikation von Desferrioxamin B jedoch trotzdem, da einige Mikroorganismen diesen Eisenkomplexbildner aufnehmen können, so z. B. Yersinia enterolytica , Streptococcus faecalis und Staphylococcus aureus . So kann es passieren, daß Patienten zwar von einem Erreger befreit werden, sich jedoch mit oben genannten Bakterien infizieren (12).

Aber auch Pflanzen können, bei einer symbiontischen Lebensweise mit Mikroorganismen, deren Siderophore teilweise nutzen wie z.B. bei Agrobacterium tumefaciens und Helminthosporium carbonium , ein für den Mais pathogener Pilz (7,37).

1.5 EISENVERSORGUNG BEI S.AUREUS

Staphylococcus aureus ist ein Gram positiver, pathogener Mikroorganismus. Er ist unter anderem ein Eitererreger und scheidet sowohl Endo- als auch Exotoxine aus (62,83). Im Falle der Endotoxine können Lebensmittelvergiftungen auftreten, wobei das Toxin auf das Darmsystem wirkt. S.aureus ist fakultativ anaerob und bildet Cytochrome nur unter aeroben Bedingungen. Neben den Arten, die pathogen im Darm des Menschen vorkommen, besiedelt S.aureus vornehmlich die Hautoberfläche und kann hierbei ebenfalls große Schäden bewirken (62).

In den vergangenen Jahren beschäftigten sich Arbeitsgruppen hauptsächlich mit dem Wachstum von S.aureus im Serum.

A.Schade bewies durch seine Versuche, daß der Eisengehalt des Serums das Wachstum von S.aureus beeinflußt. Je höher das Transferrin mit Eisen beladen wurde, umso schneller wuchs S.aureus im Serum. Die Gesamtkeimzahl nahm ebenfalls bei höherer Sättigung des Eisenbindeproteins mit Eisen zu (65). Ähnliche Ergebnisse fand Schade bei der Verwendung von Ovotransferrrin bzw. Lactoferrin. Die Proteine wurden zu Casein Medien zugegeben. Auch hier fand Schade, daß bei hohen Eisensättigungsgraden des Ovotransferrins bzw. des Lactoferrins das Wachstum von S.aureus verstärkt wird (66,73).

P.Valenti untersuchte den Einfluß von Bicarbonat und Citrat auf die bakteriostatische Wirkung des Ovotransferrins gegen Staphylococcen. Er konnte zeigen, daß die Kombination aller drei Stoffe die stärkste Wachstumshemmung hervorrief (74). Später fand Valenti, daß DNAse-, Phosphatase- und Coagulase positive Stämme von S.aureus resistent gegenüber Ovotransferrin nicht in ihrem Wachstum gehemmt werden. Bei den Coagulase negativen Stämmen beobachtete Valenti, daß etwa die Hälfte durch Ovotransferrin gehemmt werden. Zu den selben Ergebnissen kam er bei der Untersuchung von DNAse- und Phosphatase negativen Stämmen (75).

J.H.Brock zeigte, daß Desferrioxamin das Wachstum von S.aureus im Serum verstärken kann. So teilte sich S.aureus nach der Zugabe des Chelators innerhalb von 6 Stunden neun mal, in Serum alleine nur 5,6 mal. In einem zweiten Versuch gab Brock neben dem radioaktiv markierten Transferrin Desferrioxamin zum Medium und testete die Umladung des radioaktiven Eisens vom Transferrin zum Desferrioxamin. Nach 36 Stunden waren 3,4% des radioaktiven Eisens des Transferrins im Desferrioxamin gebunden. Weiterhin untersuchte Brock den Transport von Fe-Transferrin und Fe-Desferrioxamin in die Zelle. Er konnte zeigen, daß das Fe-Transferrin wesentlich uneffizienter als das Fe-Desferrioxamin transportiert wird. Allerdings sind die Transportraten niedrig im Vergleich mit denen von Yersinia enterocolitica. So ist es möglich, daß Patienten nach einer

Desferrioxamin Behandlung sowohl Infektionen durch S.aureus als auch durch Y.enterocolitica bekommen. Deswegen ist die Applikation von Desferrioxamin nicht ganz unproblematisch (12).

Zähner fand 1962 (91), daß bei S.aureus die antibiotische Wirkung von Albomycin und Ferrimycin durch Ferrioxamin B und Ferrichrom vollständig aufgehoben werden kann. Im Gegensatz dazu zeigte B.subtilis nur bei Ferrioxamin B eine vollständige Enthemmung, bei Ferrichrom hingegen konnte nur eine unvollständige Aufhebung der antibiotischen Aktivität beobachtet werden. Die Plattendiffusionstests zeigten, daß es S.aureus Stämme gibt, die eine sehr hohe Resistenzrate aufweisen, andere dagegen sind gegen Albomycin empfindlicher und zeigen relativ wenig resistente Kolonien.

Repine et al (59,60) untersuchte den Zusammenhang zwischen dem Eisengehalt der Zelle von S.aureus und dem Abtöten durch polymorphkernige Leukocyten (PML). Die PML werden nach einer Bakterieninvasion zuerst produziert und töten viele Bakterien ab, unter anderem durch die Bildung von H_2O_2. Dieses wird allerdings durch die Katalasen der Zellen zerstört. Repine züchtete Zellen in Kulturmedien, denen unterschiedliche Eisenmengen zugegeben wurden. Es zeigte sich keine eisenabhängige Synthese der Katalase. So waren Zellen, die viel Eisen enthielten, wesentlich empfindlicher gegenüber H_2O_2 als die, die mit weniger Eisen angezogen wurden. Allerdings zeigte sich keine Veränderung hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber den PMLs.

Morita fand, daß die Synthese von Enterotoxin A und B durch Magnesium und, zu einem geringeren Teil, auch eisenabhängig reguliert wird. Er ließ S.aureus Stämme in Minimalmedium wachsen, setzte Magnesium, Eisen und ein Gemisch beider Stoffe zu und testete die Produktion von Enterotoxin A und B. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß zumindest die Produktion von Enterotoxin B eisenreguliert ist. Eine Erhöhung des Eisenspiegels im Medium steigerte die Produktion des Enterotoxins. Allerdings konnte die Produktion auch durch Zugabe von Magnesium gesteigert werden. Insofern ist das Eisen wahrscheinlich nur ein Ersatz für das Magnesium (45).

Marcelis et al untersuchte die Chelatorproduktion von Staphylococcen, Enterobacteriaceen und von Streptococcus faecalis. Er zeigte, daß sich sowohl die Staphylococcen als auch die Enterobacteriaceen mit Eisen versorgen können. Er behauptete auch , daß es keinen Austausch von Chelatoren zwischen den Enterobacteriaceen und den Staphylococcen gibt (39). Maskell hingegen behauptete, daß ein Austausch der Siderophore möglich sei. Er benutzte als Testsystem das Minimalmedium D/M, was er geringfügig modifizierte (41). Beide Autoren benutzten allerdings für ihre Versuche nur Zellsuspensionen, nicht aber die zellfreien Überstände, in dem der gewünschte Siderophor nachzuweisen wäre.

1.6 ZIEL DER ARBEIT.

In der vorliegenden Arbeit versuchte ich herauszufinden, ob *S.aureus* über ein oder mehrere spezifische Eisenaufnahmesysteme verfügt. Des weiteren sollte untersucht werden, ob es ein zentrales System gibt, mit dem sich *S.aureus* mit Eisen versorgt, z.B. mit Hilfe von Siderophoren. Dazu wurde versucht, Mutanten zu finden, die unter Eisenmangel nicht mehr wachsen können. Weiterhin wurden Transportmessungen durchgeführt um das Albomycin/Ferrichrom Aufnahmesystem näher zu untersuchen.

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Reagentien der Firma Merck AG, Darmstadt.

Ampicillin	Sigma Chemie GmbH, München
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit/USA
Bacto Pepton	Difco s.o.
Bacto Trypton	Difco s.o.
BPS	Sigma s.o.
Desferrioxamin B	Ciba Geigy, Schweiz
EDDA	ICN Pharmaceuticals Inc., New York
EDTA	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Kälberserum	Sigma Chemie GmbH, München
MNNG	Fluka AG, Buchs/Schweiz
Ovotransferrin	Sigma, s.o.
Quickszint 501	Zinsser GmbH, Frankfurt
Transferrin	Sigma, s.o.
Yeast Extract	Difco s.o.

2.2 LÖSUNGEN UND MEDIEN

TY-Medium	10 g	Bacto Trypton
	5 g	Yeast Extract
	5 g	NaCl
		in 1 L dest. Wasser gelöst.
NB-Medium	8 g	Nutrient Broth
	5 g	NaCl
		in 1 L dest. Wasser gelöst.
NBD-Medium		NB-Medium mit verschiedenen Dipyridyl Konzentrationen (siehe Text).
NBE-Medium		NB-Medium mit verschiedenen EDDA Konzentrationen (siehe Test).
D/M-Lösung	7 g	K_2HPO_4
	3 g	KH_2PO_4
	0,1 g	$MgSO_4$
	1 g	$(NH_4)_2SO_4$
	0,5 g	Bacto Pepton
D/M-Medium	100,00 ml	D/M-Lösung
	1,25 ml	Glucose (40%)
TMS-Lösung	18 mg	$ZnSO_4$
	4 mg	$CuSO_4$
	2 mg	$MnSO_4 * 4\ H_2O$
	1 mg	$(NH_4)_2MO_4$
	1 mg	H_3BO_4
		In 1 L bidest. Wasser gelöst.

Zur Herstellung von Nährplatten wurde den jeweiligen Medien 15g/L Bacto Agar zugesetzt, bei Topagar 6g/L.

Ampicillin wurde in einer Konzentration von 25 µg/ml eingesetzt.

Die Hydroxamate Ferrichrom, Ferrichrom A, Ferrichrysin, Ferrirubin, Coprogen, Desferrioxamin D1, Desferrioxamin E, Schizokinen, Rhodutorulasäure, Arthrobactin und Aerobactin, sowie Enterochelin und Streptonigrin stammten von diesem Institut.

Albomycin erhielt ich freundlicherweise von H.P.Fiedler, Lehrstuhl für Mikrobiologie I.

Ferrimycin stellte mir Prof. H.Zähner zur Verfügung.

Die Radiochemikalien stammten von Radiochemical Centre, Amersham, England.

2.3 BAKTERIENSTÄMME

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
E.coli K12-Stämme		
W3110	K12-Wildtyp	dieses Institut
EN775	H1443 pColV-K311/11: Tn10	dieses Institut
S.aureus-Stämme		
DSM 346	(=ATCC 6538P) Wildtyp	dieses Institut
OH 5	Alb^r Mutante, Hydrox.$^+$	aus 346 isoliert
OH-10	Alb^r Mutante, Hydrox.$^-$	aus 346 isoliert
OH 15	MNNG Mutante, kein Wachstum auf NBE, Alb^r	aus 346 isoliert
OH-20	MNNG Mutante, kein Wachstum auf NBE, Alb^r	aus OH 10 isoliert

2.4 REINIGUNG VON EDDA (61)

10 g EDDA wurden in 190 ml 1 N HCL gelöst und zum Sieden gebracht. Nach Abkühlung auf RT wurde die Lösung filtriert und mit 1,5 l Aceton aufgefüllt. Der pH wurde mit 1 N NaOH auf 6 eingestellt. ÜN fiel bei 4°C das gereinigte EDDA aus. Nach Abfiltrieren und zweimaligen Waschen mit Aceton, wurden die Filter an der Luft getrocknet und der weiße Niederschlag mit einem Mörser zu Pulver zermahlen.

Um eine 5 mM EDDA Stammlösung herzustellen wurde wie folgt vorgegangen: 186 mg des gereinigten EDDA wurden in 40 ml 10 N NaOH unter Rühren gelöst, mit 10 N HCL auf pH 7 zurücktitriert und auf 100 ml mit H_2O bidest aufgefüllt.

2.5 EISENBESTIMMUNG MIT FERROZIN

Zur Bestimmung geringer Eisenspuren im Medium wurde die spektrophotometrische Methode nach Stookey (15,70) gewählt. 514 mg Ferrozin und 10 mg Hydroxylamin wurden in wenig Wasser gelöst. Dazu wurden 50 ml konzentrierte Salzsäure gegeben und nach dem Abkühlen der Lösung auf 20°C mit H_2O bidest auf 100 ml aufgefüllt. Für die Pufferlösung wurden 40 g Ammoniumacetat in 40 ml H_2O bidest gelöst. Nach Zugabe von 35 ml konzentrierter Ammoniaklösung wurde auf 100 ml mit H_2O bidest aufgefüllt. Der pH-Wert des Puffers betrug 5,5.

Für die Eisenbestimmung wurden die Glaswaren vorher in konzentrierter HCl gewaschen, dreimal mit H_2O bidest nachgespült, zweimal mit EDTA gewaschen (50 mM) und nochmals mit H_2O bidest nachgespült.

Bei der eigentlichen Bestimmung füllte man 5 ml der zu untersuchenden Probe in ein 20 ml Becherglas. Anschließend wurden 0,1 ml Ferrozin Lösung zupipettiert. Auf einer Heizplatte wurde dieses Gemisch 5 Minuten lang gekocht und wieder auf 20°C abgekühlt. Nach Zugabe von 0,1 ml Pufferlösung wurde auf 5 ml Endvolumen mit H_2O bidest aufgefüllt. Die entstandene rote Färbung wurde nach 5 Minuten bei 562 nm gemessen.

Für die Eichkurve wurden folgende Stammlösungen an Ammonium Eisen(II) Sulfat hergestellt: 7,5 µM; 10 µM; 12,5 µM; 15 µM; 17,5 µM und 20 µM.

2.6 ISOLIERUNG DES PIGMENTS VON S.AUREUS

Diese Methode wurde von J. Marshall (40) übernommen. Aus 1 L TY wurden die Zellen nach 24 Stunden geerntet, in Saline gewaschen und in Methanol aufgenommen (40 ml/mg TG). 10 Minuten wurde die Suspension in einem Becherglas bei 55°C im Wasserbad geschüttelt, wobei ein ständiger Strom von Stickstoff in das Gefäß geblasen wurde. Um eine Zerstörung der Carotinoide weitgehendst zu vermeiden, wurde der Versuch in gedämpften Licht durchgeführt. Nach dem Abkühlen auf RT wurden die restlichen Zellen, bzw. deren Trümmer abzentrifugiert und die Extraktion noch dreimal durchgeführt. Die vereinigten Methanolfraktionen wurden mit 1 Volumen Ethylacetat und 3 Volumina 1,7 M NaCl Lösung ausgeschüttelt. Die Ethylacetat Phase wurde gesammelt, und falls die wässrige Phase noch gefärbt war, mit mehr Ethylacetat nochmals ausgeschüttelt. Die so gewonnenen Extrakte wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und im Rotationsverdampfer bei 35°C im Vakuum eingeent. Aufgenommen wurde der Rückstand in einem Gemisch von leichtem Petroleum und Aceton (1:1, vol/vol) und bei -20°C Obernacht stehengelassen, um Phospholipide auszufällen. Der Oberstand wurde dann am gleichen Tag im biologischen Test benutzt.

2.7 WACHSTUMSBEDINGUNGEN

2.7.1 Wachstumsbedingungen im Vollmedium

Falls nicht anders beschrieben, wurde eine Vorkultur von einer Einzelkolonie auf TY ausgehend, in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane in 10 ml TY angeimpft und über Nacht bei 37°C im Wasserbad geschüttelt.

2.7.2 Wachstum in NBE, bzw. NBD Medium

Je 100 ml NB Medium wurden mit verschiedenen Dipyridyl bzw. EDDA Konzentrationen versetzt. Vom Dipyridyl wurde eine 200 mM Stammlösung in Methanol hergestellt. Die entsprechende Menge an EDDA wurde direkt ins Medium gegeben, welches zuvor mit 1N NaOH basisch gemacht wurde. Nachdem sich das eisenfreie EDDA gelöst hatte, wurde anschließend mit 10 N HCl auf einen pH-Wert von 7 zurücktitriert. Die Dipyridyl Endkonzentrationen betrugen 0,5; 1; 5 bzw. 15 mM.

Die EDDA Konzentrationen im NB Medium betrugen 0,5; 1; 5; 15 bzw. 30 mM. Die Medien wurden 2 Tage bei RT inkubiert, um eine vollständige Bindung des Eisens an die Chelatoren zu gewährleisten.

Im eigentlichen Wachstumstest wurden je 20 ml des gewünschten Mediums mit einer ON Kultur in TY zu einer OD_{578} von 0,05 angeimpft und zu verschiedenen Zeitpunkten die optische Dichte ermittelt.

Nachdem die Zellen ON bei 37°C inkubiert worden sind, wurden am nächsten Morgen aus jedem Ansatz 1,5 ml Zellsuspension entnommen, zweimal in steriler Saline gewaschen, in 1,5 ml TY aufgenommen und weitere 18 Stunden inkubiert.

2.7.3 Wachstum im Serum

Die Zellen einer ON-Kultur wurden zweimal mit steriler Saline gewaschen. Je ein Milliliter Kälberserum wurde steril in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und eine halbe Stunde bei 56°C inkubiert, um das Komplementsystem zu inaktivieren.

Das auf RT abgekühlte Serum wurde mit ca. 10^3 Zellen pro Milliliter angeimpft und bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde 0,1 ml steril entnommen und die Lebendkeimzahl bestimmt.

2.7.4 Wachstum in NB-Transferrin-Medium

Es wurde eine 1 mM Stammlösung von Transferrin hergestellt, vorsichtig mit 0,1 N HCL auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt und sterilfiltriert.

Zu 10 ml NB-Medium wurde die Stammlösung in einer Endkonzentration von 30 µM zugegeben und 3 Stunden bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Bicarbonat in einer Endkonzentration von 50 mM wurde das Medium weitere 18-21 Stunden bei RT inkubiert, um eine vollständige Bindung des Eisens an das Transferrin zu gewährleisten.

Die ON-Kultur in NB-Medium wurde zweimal in steriler Saline gewaschen und zu einer OD_{578} von ca. 0,05 in das NB Transferrin Medium angeimpft. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die optische Dichte ermittelt.

2.7.5 Beladung des Transferrins

Um das Transferrin zu 20, 40 bzw. 60% mit Eisen beladen zu können, wurden 980 µl einer 1 mM Transferrinstammlösung (pH 3,5) mit je 20 µl einer 30 mM, 60 mM bzw. 120 mM $FeCl_3$ Stammlösung versetzt und 3 Stunden bei RT inkubiert.

2.7.6 Verwertung des Transferrins

Transferrin (1 mM) wurde zu 20% mit Eisen beladen, wobei neben der Zugabe von kaltem Eisen noch $^{55}FeCl_3$ in einer Endkonzentration von 20 µM zugegeben wurde. Zu 5 ml NB Medium wurde diese Lösung in einer Endkonzentration von 30 µM gegeben und in einen Dialysesack mit dem Porendurchmesser von 2000 µ gefüllt. 20 ml NB-Tf Medium (30 µM Transferrin) wurde zu einer OD von 0,1 mit einer ON Kultur angeimpft. Dazu wurde der Dialysesack gegeben. Nach 24 Stunden wurde die Menge an aufgenommenen radioaktiven Eisens, bzw die Radioaktivität im Dialysesack bestimmt. Bei der Kontrolle wurde NB-Tf Medium mit dem Dialysesack ohne Zellen inkubiert.

2.7.7 Bestimmung von Hydroxamaten

Der Nachweis der Hydroxamate wurde nach den Verfahren von Csàky (17) und Gibson (23) durchgeführt, mit folgenden Änderungen: 1 ml Überstand einer Eisenmangelkultur wurde mit 0,2 ml 18 N H_2SO_4 versetzt, in einem Hydrolyseröhrchen zugeschmolzen und 60 Minuten bei 130°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 1,5 ml 35%iger Natriumacetatlösung zugegeben. Anschließend wurde die Lösung mit 0,5 ml Sulfanilsäure (10% in Essigsäure) und 0,2 ml Jod (1,3% in Eisessig) versetzt. Nach 5 Minuten wurde das überschüssige Jod mit 0,2 ml 0,2 M Natriumthiosulfat Lösung zerstört. Nach Zugabe von 0,1 ml Naphtyl-(1)-amin (0,6% in 30% Essigsäure) entstand im positiven Falle eine Rotfärbung, die nach 30 Minuten bei 520 nm photometrisch bestimmt wurde. Als Kontrolle diente der Stamm EN775, der das ColV Plasmid-K311/11 trägt und Aerobactin produziert.

2.7.8 Bestimmung von Phenolat (5)

1 ml Überstand einer unter Eisenmangel gewachsenen Kultur wurde mit 1 ml 0,5 N HCl angesäuert. Nach Zugabe von 1 ml Na-Nitrit / Na-Molybdat-Lösung wurde 1 ml 1 N NaOH zupipettiert und auf 5 ml mit H_2O bidest aufgefüllt. Die entstandene rote Farbe wurde photometrisch bei 520 nm gemessen. Als Kontrolle diente der E.coli K12 Wildtyp W3110.

2.7.9 Allgemeiner Test auf Chelatoren

Ein relativ unspezifischer Test auf Chelatoren besteht darin, 10 µl einer 10%igen $FeCl_3$ Lösung zu 1 ml Überstand zu pipettieren, auf Änderung der Farbe des Kulturüberstandes zu achten und gegebenenfalls ein Spektrum aufzustellen.

2.7.10 Wachstumsförderung durch Überstände

Von mehreren ÜN Kulturen, die in NB Medium mit unterschiedlich hohem Eisenmangel gewachsen waren, wurden je 10 ml abzentrifugiert und die Überstände steril filtriert. Je 5 ml der Überstände wurden zu 15 ml NB Medium mit 15 mM EDDA pipettiert und zu einer OD_{578} von 0,05 angeimpft. Das Inokulum stammt von einer ÜN Kultur in NB Medium. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die optische Dichte bei 578 nm ermittelt.

2.7.11 Wachstumsförderung durch Zellen

Zellen aus einer ÜN Kultur in NBE Medium (30 mM) wurden zweimal in frischem Medium gewaschen und erneut in NBE Medium resuspendiert. Die OD_{578} wurde auf 0,05 eingestellt. Die gleiche Prozedur wurde mit Zellen einer ÜN Kultur durchgeführt, die in NB Medium gewachsen war.

2.7.12 Wachstumshemmung

2.7.12.1 Mit Desferrioxamin B und Ascorbat

Um den Effekt bei Zugabe von Ascorbat zu Desferrioxamin B in NB Medium zu studieren, wurden von einer ON Kultur in NB Medium je 10 ml frisches NB Medium mit den entsprechenden Zusätzen zu einer OD_{578} von ca. 0,1 angeimpft und bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Trübung der Zellsuspension bestimmt.

2.7.12.2 Mit Conalbumin, Citrat und Bicarbonat

10 mg/ml Ovotransferrin wurden in NB Medium gelöst und steril filtriert. Mit frischen Zellen einer ON Kultur in NB wurden je 10 ml NB Medium, das zusätzlich unterschiedliche Citrat- und Bicarbonat Konzentration enthielt, zu einer optischen Dichte bei 578 nm von 0,05 angeimpft. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die optische Dichte ermittelt.

2.7.12.3 Mit Desferrioxamin B bei OH 10

Alb^r Mutanten, die im Plattendiffusionstest (2.11) kein Desferrioxamin mehr verwerten konnten, wurden ON in NB Medium angezogen. Von dieser Kultur wurden 10 ml NB Medium, das steigende Konzentrationen an Desferrioxamin B enthielt, zu einer OD_{578} von 0,05 angeimpft. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die optische Dichte ermittelt.

2.8 PLATTENDIFFUSIONSSYSTEM ZUM NACHWEIS VON SIDEROPHOREN

NBE Agar (44 mM EDDA) wurde hergestellt und 48 Stunden bei 4°C inkubiert, um eine möglichst vollständige Bindung des Eisens an das EDDA zu gewährleisten. Anschließend wurden ca 10^3 bis 10^4 Zellen pro Platte ausgestrichen, um einzelne Kolonien zu erhalten. Nach 15 Minuten wurden mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette 4 - 6 Löcher in den Agar gestanzt. Von Eisenlösungen unterschiedlicher Konzentrationen, Hydroxamaten und Zellsuspensionen wurden je 25 µl in die Löcher gefüllt. Für die Suspensionen wurden Zellen verwendet, die zuvor 24 Stunden in NB Medium gewachsen waren. Nach 2-tägiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten ausgewertet.

2.9 MUTAGENESEN

2.9.1 MNNG Mutagenese

Aus einer ON Kultur wurden 10 ml TY Medium zu einer OD_{578} von 0,1 angeimpft. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Zellen bei einer OD_{578} von 0,5 - 0,6 geerntet und zweimal in steriler Saline gewaschen. 20 mg MNNG wurden mit ein bis zwei Tropfen DMSO gelöst, auf 1 ml H_2O bidest aufgefüllt und zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zu der Zellsuspension pipettiert. Der Rest des MNNG wurde mit einer Spatelspitze Natriumthiosulfat entgiftet. Nach 25 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die mutagenisierten Zellen abzentrifugiert, zweimal mit steriler Saline gewaschen und auf TY Platten ausgestrichen. Zur Ermittlung der Absterberate wurde nach bestimmten Zeitpunkten aus 100 µl Zellsuspension die Lebendkeimzahl bestimmt.

2.9.2 MNNG Mutagenese mit Streptonigrin Anreicherung

Die Zellen wurden, wie unter Punkt 2.9.1 beschrieben, mutagenisiert. Nach dem 2 maligen Waschen mit steriler Saline wurden die mutagenisierten Zellen 3 Stunden in NBD (0,2 mM) inkubiert. Anschließend wurden sie auf NBD Platten ausplattiert, die zusätzlich 50 mg/ml Citrat und 5, 10, 15 bzw. 20 µg Streptonigrin enthielten. Die Platten wurden 1-2 Wochen bei 37°C inkubiert.

In einer zweiten Version wurden die Zellen, nachdem sie 3 Stunden lang in NBD inkubiert worden waren, mit 5 µg/ml Streptonigrin 40 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen wurden sie auf NB Platten ausgestrichen.

2.9.3 Mutation mit Selektion auf NBD Platten

Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.9.1 beschrieben, mutagenisiert, dann aber nicht auf TY, sondern auf NBD Platten ausgestrichen. Nach 2 tägiger Inkubation bei 37°C wurden die bis dahin gewachsenen Kolonien mit einem Filzschreiber markiert und weitere 3 - 5 Tage inkubiert. Die dann noch gewachsenen Kolonien wurden zunächst auf TY, NB und anschließend wieder auf NBD Platten zu Einzelkolonien ausgestrichen.

2.9.4 Mutation mit Ampicillin Anreicherung

Die Mutagenese wurde, wie unter Punkt 2.9.1 beschrieben, durchgeführt und anschließend 3 Stunden in NBD Medium inkubiert. 25 µg/ml Ampicillin wurden nach diesem Zeitraum zupipettiert, nach 15, 30, 45 und 60 Minuten 0,1 ml Probe entnommen und auf TY ausplattiert.

2.9.5 Test auf Eisenmangelmutanten

Die durch die verschiedenen Mutagenesen erhaltenen Mutanten wurden auf Einzelkolonien auf TY ausgestrichen. Diese wurden auf NB, NBD und NBD + 200 µM Ammonuim-Fe(II)Sulfat getestet. Solche Mutanten, die auf NB und NBD + 200 µM Fe^{3+} wuchsen, nicht aber auf NBD, wurden als Eisenmangelmutanten definiert.

2.10 ISOLIERUNG ALBOMYCIN RESISTENTER MUTANTEN

Auf einer TY-Platte wurde eine Zellsuspension mit ca. 10^8 Zellen pro Milliliter ausgestrichen, 10 µl einer Albomycin Stammlösung (1 mg/ml, 33% gereinigt) aufgetropft und bei 37°C ON inkubiert. Die so erhaltenen Mutanten wurden nochmals auf TY Platten zu Einzelkolonien ausgestrichen und im Querstrichtest auf Albomycinresistenz hin getestet.

Ca. 150 Alb^r Mutanten wurden im Querstrichtest auf Ferrimycin Sensitivität getestet. Ein Filterstreifen wurde in einer 1 mg/ml Ferrimycinlösung getränkt und 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Quer zu den auf TY Platten ausgestrichenen Alb^r Mutanten, wurde der Filterstreifen gelegt und bei 37°C ON inkubiert.

2.11 PLATTENDIFFUSIONSTESTS ZUR WACHTUMSSTIMULIERUNG MIT HYDROXAMATEN

20 ml NBE (5 mM) Agar wurden mit 3 ml NBE Topagar überschichtet, in dem die gewünschten Stämme resuspendiert worden sind. Nach 5 Minuten wurden vorsichtig Filterrondellen aufgelegt und ON bei 37°C inkubiert. Die Rondellen wurden zuvor mit je 15 µl verschiedener Hydroxamatlösungen beschickt.

Die Hydroxamate wurden jeweils in einer Konzentration von 1 mg/ml angesetzt. Folgende Substanzen wurden getestet:

Ferrichrom

Ferrichrom A

Ferrichrysin

Ferrirubin

Coprogen

Desferrioxamin B

Desferrioxamin D1

Desferrioxamin E

Schizokinen

Arthrobactin

Aerobactin

Getestet wurden auch Enterochelin, Citrat und Citrat-Eisen, wobei Citrat in zwanzigfachem molaren Überschuß angeboten wurde. Im Falle der beiden zuletzt genannten Stoffe wurde der Plattendiffusionstest auf TYE und TYE Topagar durchgeführt, da eine Wachstumsstimulierung mit Fe-Citrat nur auf TYE nicht aber auf NBE Agar zu beobachten war.

2.12 TEST AUF REDUKTASE

1 mg/ml Bethophenanthrolindisulfonsäure wurde in Wasser gelöst. Eine 1 mM Stammlösung Transferrin wurde zu 80% mit Fe^{3+} beladen (siehe Punkt 2.7.5). Zu 50 µl Transferrin Stammlöung und 100 µl der BPS Lösung wurden 850 µl einer zellfreien Kulturlösung gegeben. Die Zellen waren unter Eisenmangel (NBE, 30 mM EDDA) gewachsenen. Nach einer halben Stunde wurde die entstandene Färbung bei 572 nm gemessen.

2.13 EICHKURVE ZUR TROCKENGEWICHTSBESTIMMUNG

Mit einer ON-Kultur wurde TY-Medium zu einer OD_{578} von ca. 0,1 angeimpft. Das Wachstum wurde photometrisch verfolgt und zu bestimmten Zeitpunkten wurden je 10 ml über einen Millipore-Filter Ø 0,45 µm abgesaugt, 10-15 Minuten bei 160°C getrocknet und auf der Analysenwaage gewogen.

2.14 BELADUNG DES DFF MIT MARKIERTEM EISEN

Zu Transportstudien wurden 3 Stammlösungen von DFF-^{55}Fe mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 1 µM, 10 µM und 100 µM. In allen 3 Fällen war das DFF zu 80% mit ^{55}FE beladen.

Die 1 µM Stammlösung wurde wie folgt hergestellt: 10 µl einer ^{55}FE-Lösung (0,96 mCi/ml; 5,5 µg/ml Fe^{3+} in 0,1 N HCl) wurden mit 10 µl einer 125 µM Lösung von DFF versetzt, eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit 980 µl H_2O bidest auf ein Endvolumen von 1 ml aufgefüllt. Die anderen Stammlösungen wurden entsprechend hergestellt mit der Aussnahme, daß statt des Wassers das gleiche Volumen an 9 µM FC- , bzw. 99 µM FC-Lösung verwendet wurde.

2.15 TRANSPORTSTUDIEN

2.15.1 Ferrichrom Transport

Von einer ON-Kultur in TY-Medium ausgehend, wurden verschiedene Stämme in frisches TY überführt. Bei einer OD von 0,5 wurden die Zellen geerntet, zweimal in modifiziertem D/M-Medium gewaschen, das 100 µM NTA enthielt, in D/M-Medium aufgenommen und auf eine OD_{578} von 0,5 eingestellt. Für jede Messung wurde ein Millipore-Filter (Ø 0,45 µm) mit 2 ml LiCl (100 mM) gewaschen. Anschließend wurde ein 4 ml großes LiCl-Polster auf die Filter gegeben.

Zum Transportansatz wurden 0,9 ml Zellsuspension und 20 µl Glucose (40%) in ein Scintillationsgefäß gegeben und 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad equilibriert. Anschließend wurden 0,2 µM DFF-^{55}Fe zupipettiert (20 µl einer 10 µM Stammlösung). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde je eine Probe von 100 µl entnommen, in das LiCl-Polster pipettiert

und zweimal mit 4 ml LiCl gewaschen. Nach dem Trocknen der Filter (4 Stunden bei 70°C) wurden diese mit 5 ml Quickscint 502 versetzt und im Scintillationszähler gemessen (Programm A1). Als Kontrolle wurden 10 µl des gesamten Ansatzes auf einen Millipore-Filter pipettiert, getrocknet und ebenfalls im Scintillationszähler gemessen.

2.15.2 Berechnung der Transportrate

In die Berechnung der Transportrate fließen die optische Dichte der Zellsuspension, die Konzentration des eingesetzten Siderophors, die Radioaktivität auf dem Filter und die spezifische Radioaktivität der Kontrolle ein. Wie Abb. 10 zeigt, gilt für das Trockengewicht der Zellen:

$OD_{578} * 0,27 = x$ mg/ml Trockengewicht

Die Menge an transportiertem Eisen in pmol/mg TG läßt sich wie folgt berechnen:

$$x = \frac{p * 10}{k * 100 * z} \quad \frac{cpm * pmol * ml}{cpm * mg * ml}$$

, dabei ist:

p = cpm der Probe (100 µl),

k = Spezifische Radioaktivität der Kontrolle (10 µl)

z = Trockengewicht/ml

Die Formel entstand aus folgender Berechnung: Die cpm der Kontrolle (10 µl) wurde mit dem Faktor 100 multipliziert, um die cpm für x pMol radioaktiv markiertem Siderophor pro Milliliter zu erhalten. x pMol entspricht der eingesetzten spezifischen Radioaktivität (also z.B. 0,2 nMol/ml). Die cpm der Probe (100 µl) wurde auf 1 ml hochgerechnet und deshalb mit dem Faktor 10 multipliziert. Aus den beiden Werten (Kontrolle und Probe) kann man bereits ausrechnen, wieviel pMol/ml radioaktives Eisen aufgenommen wurde. Über die OD kann man das Gewicht der Zellen pro Milliliter bestimmen. Die ausgerechnete Aufnahme in pMpl/ml wird durch das Gewicht der Zellen dividiert. So erhält man zum Schluß die Aufnahme von radioaktivem Eisen in pMol/mg TG.

2.15.3 Herstellung 1 mM Hydroxamatstammlösungen

Die Konzentrationen der Hydroxamatlösungen wurde photometrisch bestimmt. Jeweils 1 mg Hydroxamat wurde in 1 ml H_2O gelöst. Um die gewünschte Konzentration zu erhalten, wurde die Lösung im Photometer bei den entsprechenden Wellenlängen gemessen und gegebenenfalls mit H_2O bidest verdünnt. Die molaren Extinktinskoeffizienten betragen für

Ferrichrom	2895 bei 425 nm
Ferrioxamin B	2800 bei 428 nm
Coprogen	2820 bei 434 nm

2.15.4 Energieabhängiger Ferrichrom Transport

Um entscheiden zu können, ob der FC-Transport energieabhängig ist, wurden folgende Versuche durchgeführt: Der Transport wurde, wie unter Punkt 2.15.1 beschrieben, durchgeführt, mit der Ausnahme, daß zum Zeitpunkt 0 Minuten eine steigende Konzentration an NaN_3, NaCN bzw. Arsenat zupipettiert wurde. Die so erhaltenen Werte wurden mit den Transportraten ohne Zugabe der Inhibitoren verglichen. Zur Kontrolle wurde bei jedem Versuch die Lebendkeimzahl vor und nach dem Transport gemessen.

2.15.5 Zeitabhängiger FC-Transport

Der FC-Transport wurde wie unter Punkt 2.15.1 beschrieben durchgeführt. Die Zeitabstände zwischen den Probenentnahmen betrugen jedoch nur 1 Min. Es wurden 30 Messungen durchgeführt.

2.15.6 Fe-Transferrin Transport

Die Stämme 346, OH 10 und OH 15 wurden in TY angezogen, gewaschen und in D/M Medium resuspendiert. Das Transferrin wurde, wie unter Punkt 2.7.5 beschrieben, zu 60% mit $FeCl_3$ beladen. Zusätzlich wurde noch 0,2 µM $^{55}Fe^{3+}$ zupipettiert. Bei Zugabe von 10 µl zu einem Endvolumen von 1 ml ergibt sich daraus eine Konzentration von 10 µM Transferrin im Transportansatz. Als Kontrolle diente der Ferrichrom

Transport des Wildtyps, bei dem die Konzentration des Ferrichrom bei 1 µM lag.

2.15.7 Sättigungskinetik des Ferrichromtransports

Die gewaschenen Zellen wurden in D/M-Medium resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,5 eingestellt. Je 0,9 ml wurden in ein Scintillationsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 20 µl 40%iger Glucoselösung wurde die Suspension 5 Minuten lang bei 37°C im Wasserbad equilibriert. Anschließend wurde das markierte Ferrichrom zugegeben. Nach 5 und 10 Minuten wurden 0,1 ml entnommen, zweimal mit LiCl gewaschen und getrocknet. Die Konzentrationen des Ferrichroms betrugen 0,05 µM; 0,1 µM; 0,2 µM; 0,5 µM; 1 µM; 2 µM; 5 µM; 10 µM und 20 µM. Die Differenz der Aktivitäten nach 5 Minuten und nach 10 Minuten wurde berechnet und durch den Faktor 5 geteilt, um eine Aktivität in pmol/mg*TG*Min zu erhalten.

2.15.8 Km-Wert Bestimmung

Ausgehend von den Daten der Sättigungskinetik konnte der Km-Wert mittels eines Lineweaver Burk Diagramms bestimmt werden. Dazu wurden die Meßergebnisse in der doppelt reziproken Form 1/v gegen 1/[A] dargestellt. Hier bedeutet v die Transportrate, also x pmol FC/mg * TG * Min und [A] die FC-Konzentration. Der Schnittpunkt mit der Abscisse ist -1/Km, woraus sich der Km-Wert berechnen läßt.

2.15.9 Hemmung der FC Aufnahme

Ferrioxamin B, Coprogen, Ferrichrom und Enantio-Ferrichrom wurden 5 Minuten vor der Zugabe des markierten Ferrichroms dem Transportansatz zugegeben. Die Konzentration des Ferrichroms betrug 0,5 µM, die der Inhibitoren 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 und 20 µM. Nach 3, 6, 9, 12 und 15 Minuten wurden 0,1 ml der Zellsuspension über einen Millipore Filter gegeben und zweimal mit LiCl gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Aktivität der Filter ermittelt.

2.15.10 Pulse-Chase mit kaltem FC

Der Wildtyp 346 wurde in TY angezogen, gewaschen und in D/M Medium resuspendiert. Der Ferrichrom Transport wurde, wie unter Punkt 2.15.1 beschieben, durchgeführt. Nach 12 Minuten wurde unmarkiertes Ferrichrom, bzw. Coprogen in 50 fach molaren Überschuß angeboten. Nach weiteren 3, 6, 9 und 12 Minuten wurde wieder die Aktivität der Zellen ermittelt.

2.15.11 Fe-Citrat Transport

Für den Transport von Fe-Citrat wurden 0,5 ml einer 1M Lösung von Trinatriumcitrat mit 0,5 ml einer 50 mM $FeCl_3$ Lösung versetzt und 12 Stunden bei RT inkubiert. 10 µl einer 0,2 mM ^{55}Fe markierten $FeCl_3$ Lösung wurden zu dem Ansatz zupipettiert und weitere 5 Stunden inkubiert. 20 µl dieser Lösung wurden zu 980 µl Zellen + Glucose zugegeben. Der weitere Ablauf des Transports wurde durchgeführt, wie unter Punkt 2.15.1 beschrieben.

2.15.12 RA- und Aerobactin-Transport

Im Gegensatz zu den Hydroxamaten Coprogen, Ferrichrom und Ferrioxamin B mußte die Rhodutorulasäure zuerst bei niedrigem pH gelöst werden. Dazu wurden 1 mg/ml RA in einem 50 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 3,5) gelöst. Nach Zugabe von 0,2 mM ^{55}Fe wurde vorsichtig mit einem Phosphatpuffer (pH-Wert 8,0) auf einen pH-Wert von 7,0 zurücktittriert. Der Transport wurde, wie unter Punkt 2.15.1 beschrieben, durchgeführt.

2.15.13 Coprogen Transport

Die Aktivität des Coprogens betrug 50000 dpm/ml, die Konzentration 10 µM. Der Transportansatz hatte ein Endvolumen von 10 ml. Nach 3, 6, 9, 12 und 15 Minuten wurden je 1 ml Probe entnommen, mit LiCl gewaschen, getrocknet und im Counter mit dem Programm A2 gemessen. Die Konzentration des Coprogens im Transportansatz betrug 1 µM.

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

3.1 WACHSTUM IN NBD UND NBE

Beim Wachstum des Stamms 346 in NBD und NBE war es schwierig, Eisenmangelbedingungen zu definieren, da keine drastische Verlangsamung des Wachstums aufgrund eines Eisenmangels festzustellen war. Am besten läßt sich dies bei der Zugabe hoher Konzentrationen von EDDA (15 und 30 mM) erkennen. Hier war kein vollständiger Wachstumsstop zu beobachten, auch nicht bei den höchsten Konzentrationen (siehe Abb.1). Zellen, die auf NBE Platten ausgestrichen wurden, die ebenfalls 15 bzw. 30 mM EDDA enthielten, wuchsen dementsprechend ÜN auch zu Einzelkolonien heran.

Bei der Zugabe von Dipyridyl zeigte sich zwar, daß schon bei einer Endkonzentration von 1 mM ein deutlich verlangsamtes Wachstum zu beobachten war, doch wurden die Zellen so geschädigt, daß sie am nächsten Tag nicht mehr in TY anwuchsen. So zeigt Abb.2 nicht unbedingt Eisenmangel. Die Kurven könnten auch dadurch entstanden sein, daß das Dipyridyl die Zellen schädigt. Diese Vermutung konnte auch durch Versuche auf NBD Platten bestätigt werden. Bei einer Endkonzentration von 5, 10 oder 15 mM Dipyridyl im NB Agar wuchs der Wildtyp nicht mehr zu Einzelkolonien heran. Auch bei Zugabe von 1, 5 oder 10 µM Fe^{3+} oder bei entsprechenden Konzentrationen an Ferrichrom konnte kein Wachstum beobachtet werden.

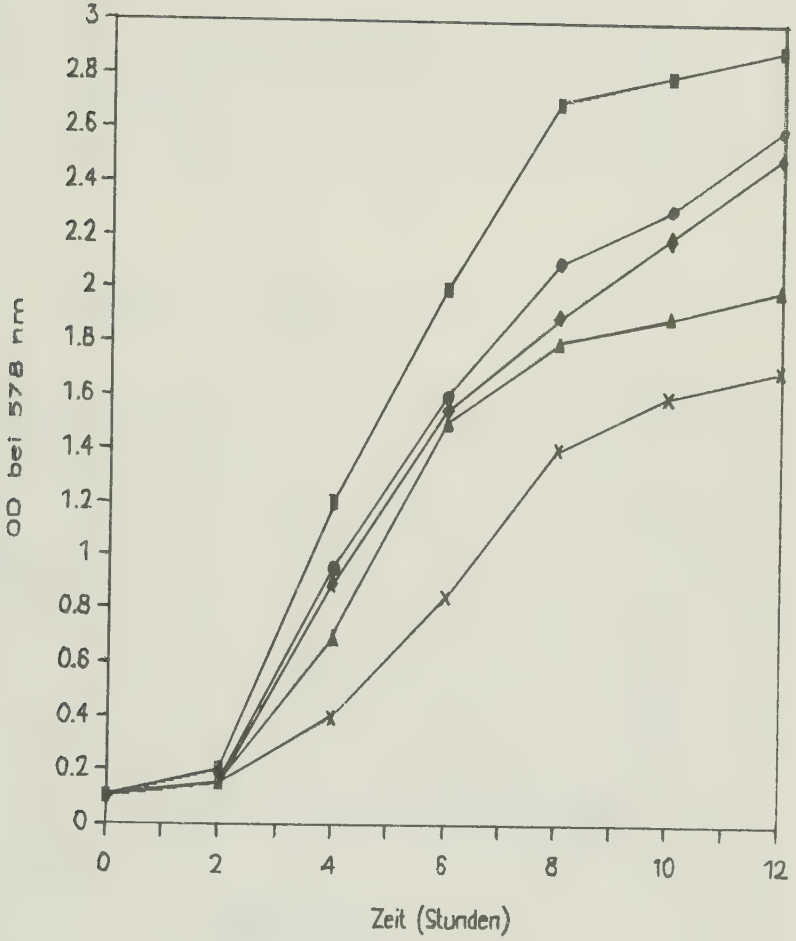

Abb. 1 Wachstum in NBE
Der Stamm 346 wurde ON in NB angezogen. Frisches NB Medium mit unterschiedlichen EDDA-Konzentrationen wurde zu einer OD von 0,1 angeimpft. ■ = Kontrolle in NB; ● = + 0,5 mM; ♦ = + 1 mM; ▲ = + 10 mM; x = + 30 mM EDDA

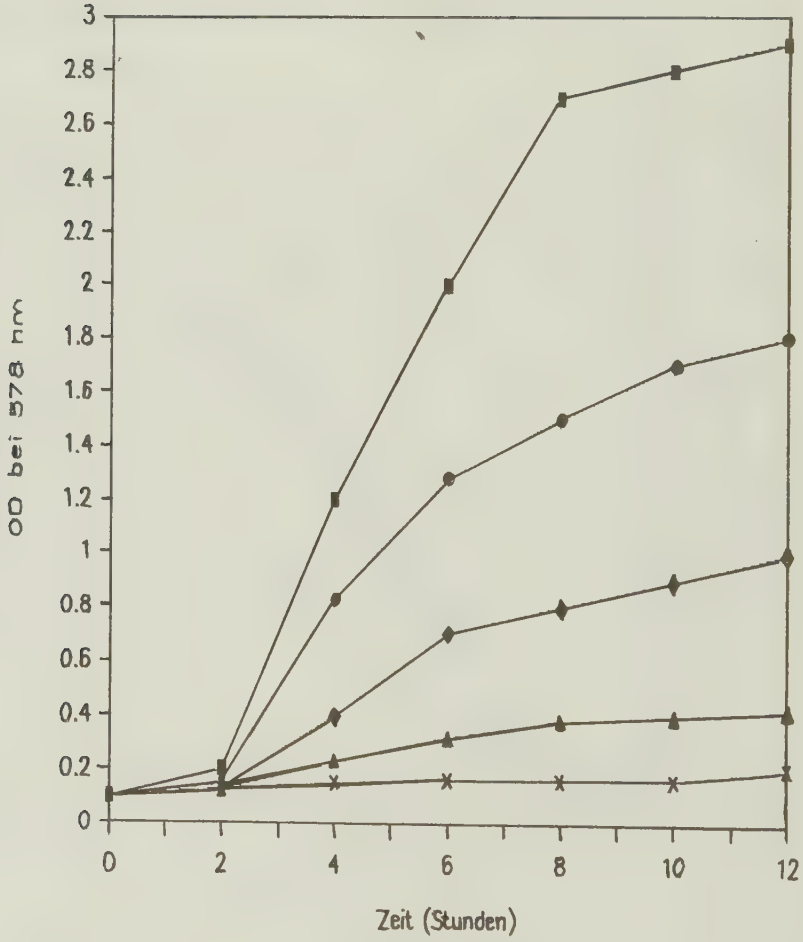

Abb. 2 Wachstum in NBD
Der Stamm 346 wurde ON in NB angezogen. Frisches NB Medium mit unterschiedlichen DiP-Konzentrationen wurde zu einer OD von 0,1 angeimpft. ■ = Kontrolle in NB; ↑ = + 0,5 mM; ◆ = + 1 mM; ▲ = + 10 mM; X = + 30 mM Dipyridyl

3.2 MUTAGENESEN

Wie in Abb.1 zu erkennen ist, wächst der Wilttyp 346 auch noch bei sehr hohen Konzentrationen an EDDA (30 mM) in NB Medium. Ich versuchte daraufhin Mutanten zu isolieren, die unter diesen Eisenmangelbedingungen nicht mehr in der Lage sind zu wachsen. Dazu isolierte ich zunächst Alb^r Mutanten und testete diese auf Wachstum in NBE (30 mM EDDA), um herauszufinden, ob es sich bei dem Ferrichromaufnahmesystem um das einzige spezifische Eisentransportsystem von S.aureus handelt.

3.2.1 Isolierung von AlbOr Mutanten

Die Isolierung der Mutanten wurde in 2.10 beschrieben. Von Einzelkolonien ausgehend wurden 167 Mutanten mit Hilfe des Plattendiffusionstest (2.11) auf Wachstumsstimulierung mit Ferrichrom getestet. 144 Mutanten zeigten keine Wachstumsstimulierung mit den angebotenen Chelatoren. Alle Mutanten wuchsen auf NBE (30 mM EDDA). Eine dieser Mutanten (OH 10) wurde auf Wachstum im Medium (NBE, 30 mM EDDA) getestet. Abb.3 zeigt, daß es keinen Unterschied im Wachstum zwischen dem Wildtyp und der Alb^r Mutante OH 10 in NB Medium mit EDDA (30 mM) gibt. Bei 23 Mutanten konnte ein Wachstum nachgewiesen werden. Die Größe der Wachstumshöfe war nahezu identisch mit denen des Wildtyps 346 (23 bzw 24 mm). Die Größe der Wachstumshöfe bei Zugabe verschiedener Chelatoren variierte nicht, d.h. die Wachstumshöfe waren zwischen 22 und 25 mm groß. Auch diese Mutanten wuchsen alle auf NBE. Der einzige Unterschied zum Wildtyp bestand aus der Albumycin Resistenz. Eine Mutante von diesem Mutationstyp war OH 5.

Bei der Untersuchung der Kreuzresistenz zwischen Albomycin und Ferrimycin zeigte sich, daß alle 167 Alb^r Mutanten auch $Ferrimycin^r$ waren.

Da auch die Alb^r Mutante OH 10 in NB Medium mit EDDA (30 mM) wuchs, wurde versucht, MNNG Mutanten zu isolieren, die unter Eisenmangel (NBE, 30 mM EDDA) nicht mehr wachsen können. Die Mutagenesen wurden sowohl mit dem Wildtyp 346, als auch mit der Alb^r Mutante OH 10 durchgeführt.

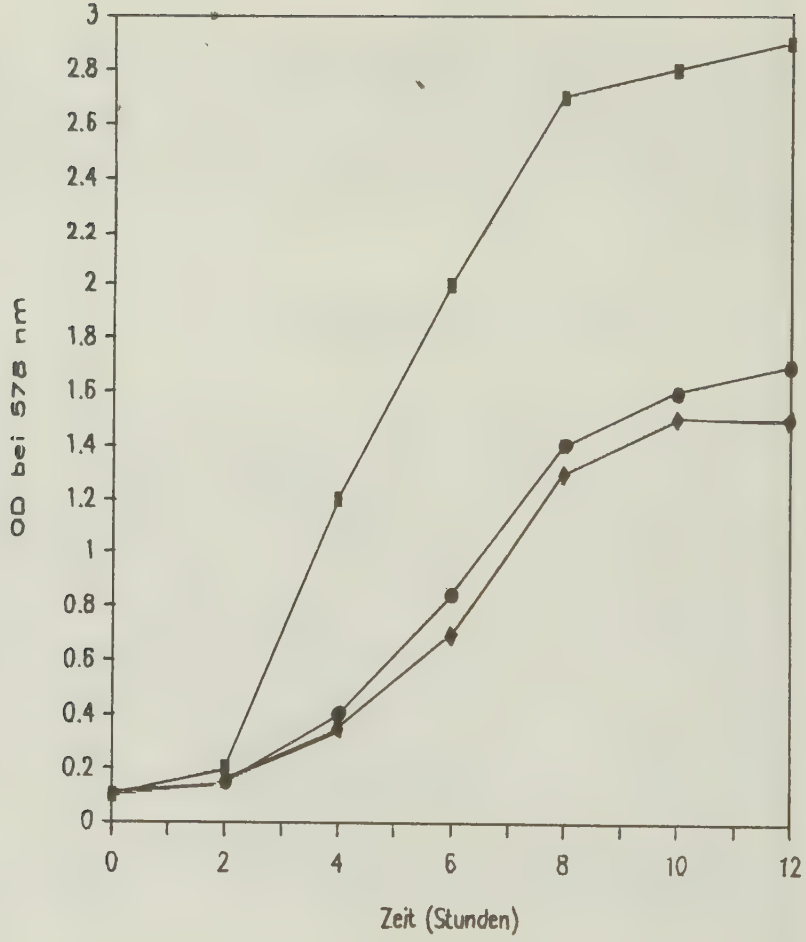

Abb. 3 Wachstum der Stämme 346 und OH 10 in NBE
Die Stämme 346 und OH 10 wurden ON in NB angezogen. Frisches NB Medium mit 30 mM EDDA wurde zu einer OD von 0,1 angeimpft. ■ = Kontrolle in NB (346); NBE (30 mM EDDA): + = 346; ◆ = OH 10 (OH 10 wuchs in NB Medium wie der Wildtyp)

3.3 MNNG-MUTAGENESEN

Nachdem festgestellt wurde, daß nach 25 Minuten und einer MNNG Konzentration von 100 µg/ml 99,99% der Zellen abgetötet wurden, sind alle folgenden Mutagenesen zu diesem Zeitpunkt gestoppt worden. Bei der MNNG Mutagenese wurden, wie unter Punkt 2.9.1 beschrieben, die mutagenisierten Zellen nach dem Waschen in Saline ohne weitere Anreicherung auf TY Platten ausgestrichen. Von diesen Zellen wurden nach 2 Tagen Inkubationzeit, willkürlich ca. 1000 auf TY (Kontrolle) bzw. NBE (0,5 mM) ausgestrichen und einen weiteren Tag bei 37°C inkubiert. Bei dieser Mutationsart erhielt ich 12 Mutanten, die folgenden Phänotyp besaßen:

1. Kein Wachstum auf NBE (0,5 mM EDDA)
2. Wachstum auf NBE (0,5 mM EDDA) + 10 µM Ammoniumeisensulfat
3. Wachstum auf NB
4. Wachstum auf TY

Im Unterschied zum Wildtyp 346 und der Alb^r Mutante OH 10 wuchsen die Mutanten jedoch auf NB Platten zu kleineren Kolonien heran.

3.3.1 Mit Streptonigrin Anreicherung

Diese Mutagenese wurde unter Punkt 2.9.1 beschrieben. Die MIC des Streptonigrins beträgt für S.aureus 0,39 µg/ml. Die Platten wurden dann ein bis zwei Wochen bei 37°C inkubiert. Bei allen SN Konzentrationen konnten nach dieser Zeit kleine Kolonien isoliert werden. Diese wurden wiederum auf TY bzw. NBE (0,5 mM EDDA) ausgestrichen. Die so erhaltenen Mutanten wurden im Kreuztest gegen SN getestet (10 µg/ml Stammlösung). Fünf Mutanten waren bei dieser Konzentration des SN resistent, der Wildtyp jedoch nicht. Alle 5 Mutanten wuchsen aber sowohl auf TY, als auch auf NBE (0,5 mM EDDA) Platten.

3.3.2 Mit Selektion auf NBE (0,5 mM EDDA)

Nach dem Waschen wurden die mutagenisierten Zellen auf NBE (0,5 mM EDDA) ausgestrichen. Nach 2 Tagen wurden die bis dahin gewachsenen Kolonien markiert und weitere 2 Tage inkubiert. Die dann noch gewachsenen neuen Zellen wurden wie üblich auf TY und NBE (0,5 mM EDDA) zu Einzelkolonien

ausgestrichen. Auf diesem Wege erhielt ich 7 Mutanten, die den in 3.3 beschriebenen Phänotyp zeigten.

3.3.3 Mit Ampicillin Anreicherung

Die Zellen wurden mit MNNG mutagenisiert und mit Ampicillin angereichert (2.9.4).

3.4 PROBLEME MIT MUTANTEN

Alle Mutanten wurden in 30% Glycerin bei -20°C aufbewahrt. Trotzdem erwiesen sich die Mutanten als sehr instabil. Von insgesamt 27 Mutanten zeigten nur 2 den unter Punkt 3.3 beschriebenen stabilen Phänotyp. Beide Mutanten stammten aus der Ampicillinanreicherung. Die Mutante OH 15 wurde aus dem Wildtyp 346, die Mutante OH 20 aus der Alb^r Mutante OH 10 isoliert. Alle anderen Mutanten wuchsen nach 2-3 Passagen auf NBE (0,5 mM EDDA) Platten wieder zu Einzelkolonien heran. Das erfolgte auch bei den tiefgefrorenen, in Glycerin aufbewahrten Zellen.

3.4.1 Physiologische Merkmale der MNNG Mutanten

Beide nach der Anreicherung mit Ampicillin übrig gebliebenen Mutanten zeigten den gleichen Phänotyp. Sie wuchsen in TY und NB langsamer und schlechter als der Wildtyp. Abb.4 zeigt das Wachstum des Wildtyps 346 im Vergleich zu der Mutante OH 15 in NB und TY Medium. Die Mutante OH 20 zeigte den gleichen Wachstumsverlauf wie die Mutante OH 15. Abb.5 zeigt den Wachstumsverlauf der Mutante OH 15 in NBE Medium (0,5 mM EDDA), das eine EDDA Konzentration von 0,5 mM enthielt. Hier erkennt man, daß schon bei dieser geringen Konzentration des EDDAs kein Wachstum der Mutante OH 15 mehr zu beobachten war. Diese Mutante war zusätzlich Alb^r geworden. Beide Mutanten wuchsen im Plattendiffusionstest nach 2.11 nicht mehr mit den angebotenen Hydroxamaten, auch nicht mit Fe-Citrat. Nur bei der Zugabe von Ammoniumeisensulfat (15 µl einer 1 µM $FeCl_3$ Lösung auf eine Filterrondelle) zeigte sich ein Wachstumshof mit einem Durchmesser von 20 mm.

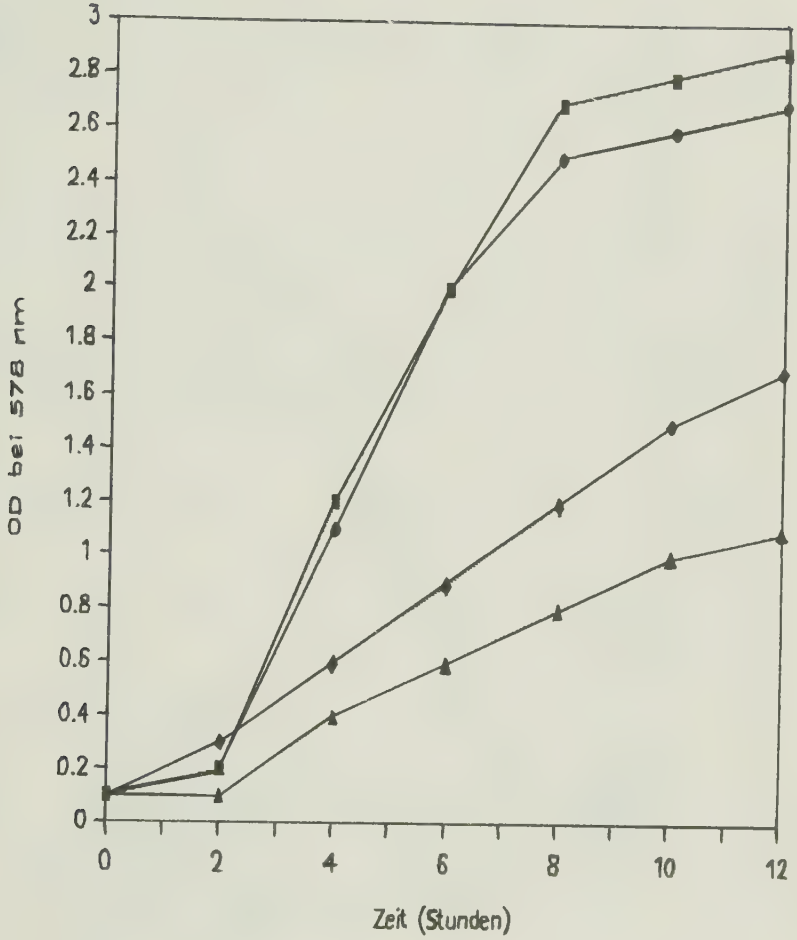

Abb. 4 Wachstum in TY und NB
Wildtyp 346 und Mutante OH 15 wurden in TY angezogen. Frisches TY und NB Medium zu einer OD von 0,1 angeimpft. TY: ■ = 346; ♦ = OH 15; NB: + = 346; ▲ = OH 15

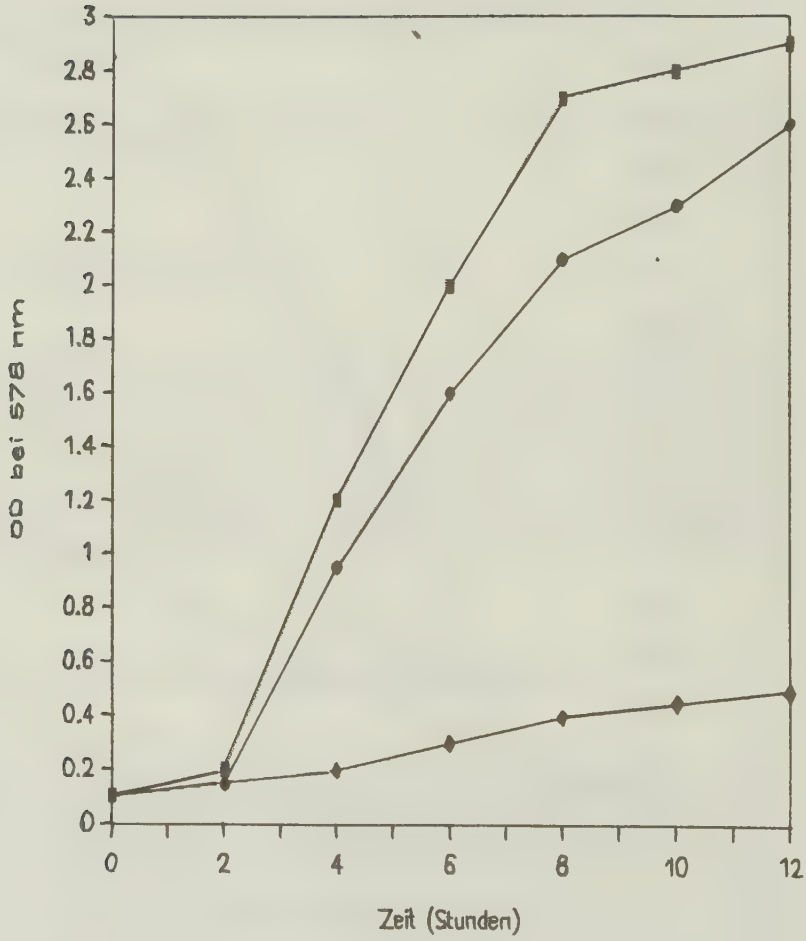

Abb. 5 Wachstum der MNNG Mutante OH 15 in NBE Medium
Die Stämme 346 und OH 15 wurden in TY angezogen. Von dieser Kultur ausgehend wurde frisches NB und NBE Medium (0,5 mM EDDA) zu einer OD von 0,1 angeimpft. NB: ■ = 346; NBE (0,5 mM EDDA): ● = 346; ◆ = OH 15

3.4.2 Plattendiffusionstests mit Topagar

Die Schwierigkeit im Aufbau dieses Testsystems lag darin, daß der Wildtyp 346 und die Alb^r Mutanten OH 5 und OH 10 auf NBD (200 µM DiP) ÜN zu einem Rasen heranwuchs, so daß keine Stimulierung des Wachstums mit Ferrichrom oder anderen Siderophoren zu beobachten war. Durch höhere Dipyridyl Konzentrationen gelang es zwar, das Hintergundwachstum zu reduzieren, jedoch konnte mit den angebotenen Chelatoren kein oder ein nur geringes Wachstum festgestellt werden.

Bei der Verwendung von EDDA sah dies anders aus: eine Endkonzentration von 5 mM unterdrückte das Wachstum der Staphylococcen soweit, daß trotz eines relativ starken Hintergrundwachstums Wachstumshöfe bis zu 24 mm Durchmesser deutlich sichtbar wurden. Bei niedrigeren Konzentrationen wuchsen die Staphylococcen zu einem Rasen aus, der so dicht war, daß keine Wachstumsstimulierung zu beobachten war. Bei EDDA Konzentrationen, die größer als 5 mM waren, wurde das Hintergrundwachstum zwar weiter eingeschränkt, jedoch wurden die Wachstumshofdurchmesser sehr klein (< 13 mm bei 15 mM EDDA), so daß für diese Versuche die Konzentration des EDDAs von 5 mM gewählt wurde.

Bei den 11 getesteten Substanzen ergaben sich folgende Wachstumshöfe:

Tab.1 Wachstumsstimulierung durch Siderophore

	Wachstumshofdurchmesser in mm		
Stamm	346	OH 5	OH 10
Ferrichrom	24	23	-
Ferrichrom A	24	23	-
Ferrichrysin	23	23	-
Ferrirubin	22	23	-
Desferrioxamin B	24	24	-
Desferrioxamin D1	23	24	-
Desferrioxamin E	21	22	-
Schizokinen	20	22	-
Coprogen	21	20	-
Arthrobactin	22	22	-
Aerobactin	-	-	-
Ferrithiocin	-	-	-
Enterochelin	-	-	-
Fe-Citrat	18	17	18

Die Konzentration der Chelatoren betrug jeweils 1 mg/ml. Alle Versuche wurden auf NBE (5 mM), Fe-Citrat auf TYE durchgeführt. Da kein Wachstum mit Fe-Citrat auf NBE beobachtet werden konnte, wurde TYE gewählt.

Alle 144 Alb^r Mutanten wurden auf Wachstum mit den eben genannten Siderophoren getestet. Es konnte keine Mutante isoliert werden, die nur mit einem Siderophor wuchsen.

3.5 WACHSTUM UNTER EISENMANGEL

Da Hydroxamate auf EDDA Platten das Wachstum der Mutante OH 10 nicht förderten wurde versucht, Eisenmangel durch die Zugabe von Desferrioxamin B zu schafffen.Das Ziel dieses Versuches war es, herauszufinden, ob sich der Wildtyp 346, der mit Desferrioxamin B wachsen kann, im Wachstumsverlauf von der Alb^r Mutante OH 10 unterscheidet. Abb.6 zeigt, daß auch bei einer Konzentration von 0,2 mM Desferrioxamin B kein Unterschied im Wachstum beider Stämme zu erkennen ist. Asbeck et al. (6) zeigte, daß klinische Isolate von S.aureus unter Eisenmangel geraten, wenn sie in einem Kulturmedium wachsen, das Desf. B und Ascorbat enthält. Um dies für die Mutante OH 10 und OH 15 zu prüfen, wurden je 10 ml NB Medium mit den ÜN-Kulturen des Wildtyps 346 und den Mutanten OH-10 und OH 15 zu einer OD von 0,1 angeimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 500 µg Desf. B und 400 µg Ascorbat. Nach 8 Stunden wurde die Optische Dichte ermittelt. Es war kein unterschiedliches Wachstum beim Wildtyp 346 und der Alb^r Mutante OH 10 zu erkennen. Nach 8 Stunden betrug die OD 2,5. Die MNNG Mutante OH 15 wuchs innerhalb von 8 Stunden auf eine optische Dichte von 0,9.

Um das Wachstumsverhalten im Serum zu untersuchen, wurden die Stämme 346, OH 10 und OH 15 in Kälberserum angeimpft. Der Wachstumsverlauf in Abb.7 zeigt, daß der Wildtyp 346 und die Alb^r Mutante OH 10 wie in den vorangegangenen Versuchen nahezu identisch wuchsen. Innerhalb von 24 Stunden wuchsen die Zellen von ca. 5×10^2 auf ca. 10^8 Zellen/ml heran. Die MNNG Mutante OH 15 wuchs wesentlich langsamer und erreichte nach 24 Stunden eine Zellzahl von ca. 5×10^4 Zellen/ml.

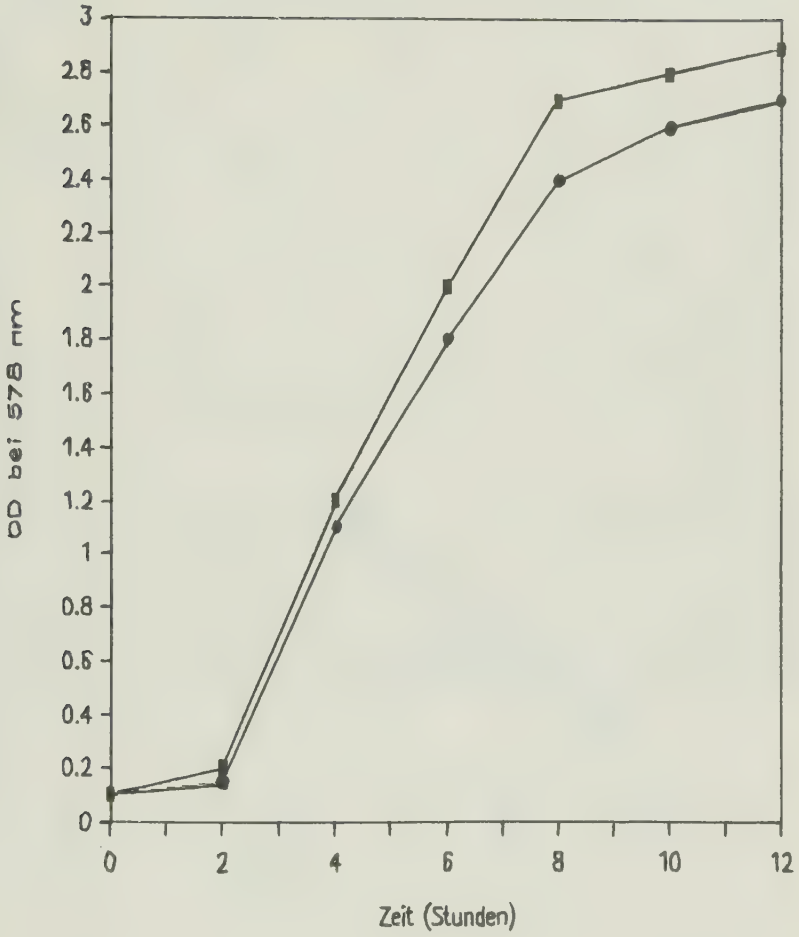

Abb. 6 Wachstum der Stämme 346 und OH 10 in NB-Desf.B
Aus einer ÜN Kultur der Stämme 346 und OH 10 wurde NB Medium mit 0,2 mM Desferrioxamin B zu einer OD von 0,1 angeimpft. ▮ = 346; + = OH 10

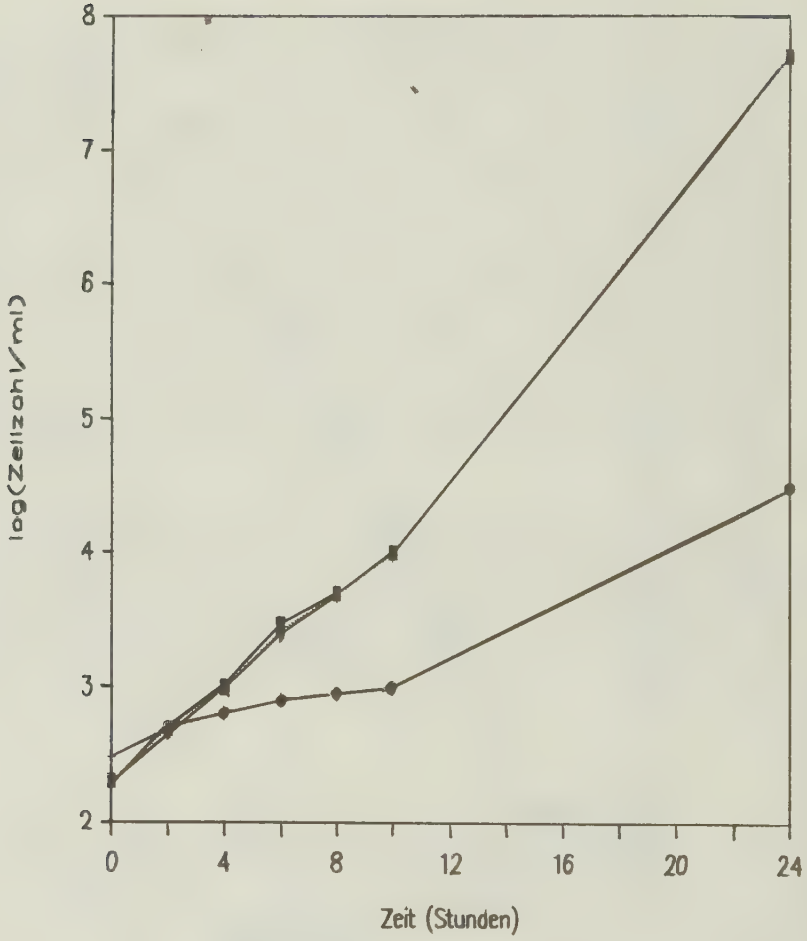

Abb. 7 Wachstum im Serum
Die Stämme 346, OH 10 und OH 15 wurden von einer ON Kultur, nach zweimaligem Waschen, in steriles Serum angeimpft, dessen Komplement inaktiviert wurde. ▮ = 346; ▼ = OH 10; + =OH 15

Da der Wildtyp 346 und die Alb^r Mutante OH 10 im Serum wachsen, sollte untersucht werden, ob die Stämme das Transferrin-Eisen direkt verwerten können. Dazu wurde Transferrin in einer Konzentration von 30 µM zu NB Medium gegeben (siehe Punkt 2.7.4 und 2.7.5). Das Medium wurde zu einer OD von 0,1 mit den Stämmen 346 und OH 10 angeimpft. Der Wachstumsverlauf in Abb.8 zeigt, daß bei 30% Eisensättigung des Transferrins ein relativ langsames Wachstum stattfindet. So wachsen die Zellen innerhalb von 10 Stunden auf eine OD von 0,5 bis 0,6. Bei 60% Eisensättigung des Transferrins wächst der Wildtyp 346 und die Alb^r Mutante OH 10 wesentlich besser als bei 30% Eisensättigung (OD von 1,1 bzw. 1,2). Das Wachstum der Kontrolle in NB Medium allerdings ist immer noch fast 50% höher (OD von 2,4 bzw 2,5). Eine weitere Untersuchung, ob das im Transferrin gebundene Eisen von S.aureus verwertet werden kann, wurde unter Punkt 2.7.6 beschrieben. In 100 µl Zellen wurden nach 24 Stunden 2477 cpm gemessen. Leider wurde die Radioaktivität des Überstands nach dem Abzentrifugieren der Zellen nicht bestimmt. Im Dialysesack wurden 2056 cpm/100 µl gemessen. In der Kontrolle, bei der keine Zellen enthalten waren, wurde eine Radioaktivität von 1511 cpm/100 µl, im Medium 1691 cpm/100 µl gemessen.

Ähnliche Ergebnisse wie bei dem Wachstum mit Transferrin, zeigten sich auch bei Ovotransferrin. NB Medium mit 20 mg/ml Ovotransferrin, Citrat (10 mM) und Bicarbonat (50 mM) wurde mit den ON Kulturen der Stämme 346, OH 10 und OH 15 zu einer OD von 0,1 angeimpft. Nach 10 Stunden wurde die optische Dichte wieder ermittelt. Der Wildtyp 346 als auch die Alb^r Mutante OH 10 wuchsen auf eine OD von ca. 0,6. Die MNNG Mutante OH 15 wuchs auf eine OD von 0,3. Nachdem das Ovotransferrin zu 60% mit Eisen gesättigt wurde, wuchsen der Wildtyp 346 und die Alb^r Mutante OH 10 auf eine OD von 1,3; die MNNG Mutante OH 15 auf 0,6.

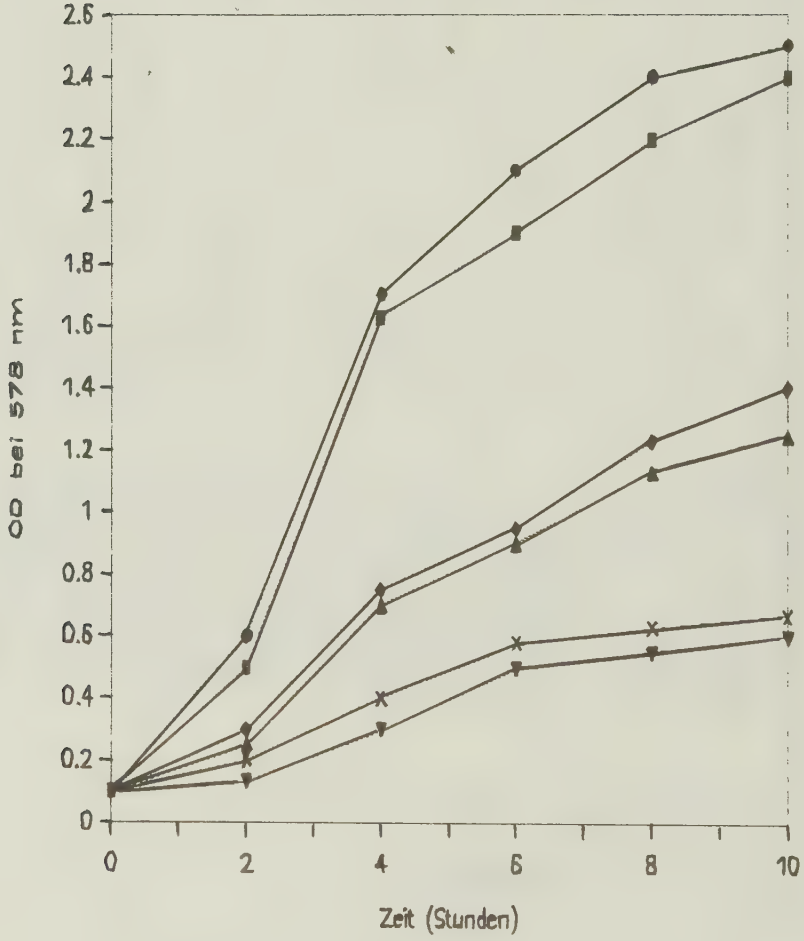

Abb. 8 Wachstum mit Transferrin
NB-Tf Medium wurde aus einer ON Kultur der Stämme 346 und OH 10 zu einer OD von 0,1 angeimpft. Kontrolle in NB: ■ = 346; ▲ = OH 10; NB-Tf (30% Sättigung): ✕ = 346; ▼ = OH 10; NB-Tf (60% Sättigung): ◆ = 346; = ▲ = OH 10

3.6 NACHWEIS VON SIDEROPHOREN

Um zu untersuchen, ob S.aureus einen Siderophor ausscheidet, der Hydroxamat oder Phenolatgruppen enthält, die mit chemischen Methoden nachzuweisen sind, wurde der Wildtyp 346 unter verschiedenen Eisenmangelbedingungen angezogen. Von ON Kulturen in NB, die mit Dipyridyl (0,2 mM), EDDA (30 mM) und Transferrin (30 µM, 16% Sättigung) wuchsen, wurde der Überstand auf Phenolat und Hydroxamat getestet. Der Sättigungsgrad des Transferrins beruht auf der Eisenbestimmung des NB Mediums. Hier zeigte sich, daß das NB Medium 11 µM Eisen enthält, was der Eisenbestimmung von Marcelis (39) nahekommt, der einen Eisengehalt von ca. 9 µM ermittelte (siehe Abb.9). Da ein Molekül Transferrin 2 Eisenionen bindet, ergibt sich ein Sättigungsgrad von ca. 16%. Bei der Bestimmung des Phenolats wurde als Kontrolle der E.coli K12 Wildtyp W3110 getestet, der Enterochelin produziert. Der E.coli K12 Stamm EN775 diente zur Kontrolle bei der Hydroxamat Bestimmung. Dieser Stamm ist aroB, trägt das pColV-K311/11 Plasmid und ist dadurch befähigt, Aerobactin zu synthetisieren.

Bei dem E.coli Stamm W3110, der in NBD (0,2 mM DiP) angezogen wurde, konnte das Enterochelin nachgewiesen werden. Die Methode zum Nachweis von Phenolat wurde in 2.7.8 beschrieben. Der so ermittelte Wert lag bei ca. 80 µM Phenolat für den E.coli Stamm W3110. Bei der Untersuchung der Kulturüberstände der Staphylococcen zeigten keine Phenolatgruppen. Aerobactin konnte in dem E.coli Stamm EN775 nachgewiesen werden. Der Test weist Hydroxamsäuregruppen nach (siehe Punkt 2.7.7). Er wurde nur visuell ausgewertet. Das Aerobactin des E.coli Stamms EN775 erzeugte nach dem Test eine dunkelviolette Farbe. Bei den Staphylococcen blieb der Überstand völlig farblos. Zusätzlich zu den Nachweisen im Überstand wurden auch die Zellen der Bestimmung unterzogen, um ausschließen zu können, daß Siderophore der oben genannten Stoffklassen zellgebunden vorkommen. Für die Bestimmung wurden aus je 50 ml Medium die Zellen geerntet (Die genauen Eisenmangelbedingungen sind in diesem Kapitel weiter oben beschrieben). Es konnten weder Hydroxamat noch Phenolatgruppen nachgewiesen werden.

Beim allgemeinen Nachweis von Siderophoren, wie unter Punkt 2.7.9 beschrieben, wurde D/M Medium gewählt, um die Zugabe von EDDA bzw. DiP zu umgehen. Der Eisengehalt des Mediums betrug 1 µM. Bei der positiven Kontrolle mit dem E.coli K12 Stamm EN775 entstand nach der Zugabe von 10 µl einer $FeCl_3$ Lösung (10%) eine braunrötliche Färbung, wohingegen beim S.aureus Wildtyp 346 keine Färbung auftrat.

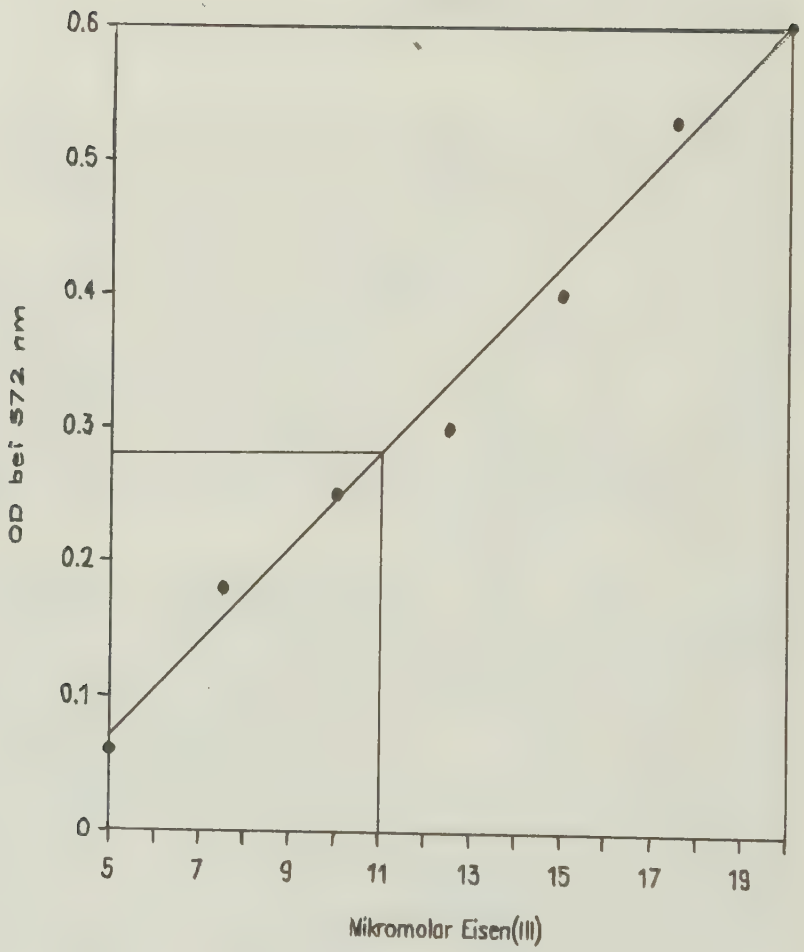

Abb. 9

Für die Eichkurve wurden verschiedene Stammlösungen von Ammonium Eisen(II) Sulfat hergestellt: 7,5 µM; 10 µM; 12,5 µM; 15 µM; 17,5 µM und 20 µM. Bei der Eisenbestimmung in NB Medium wurde eine OD_{3+} von 0,29 gemessen. Dies entspricht 11 µM Fe^{3+}

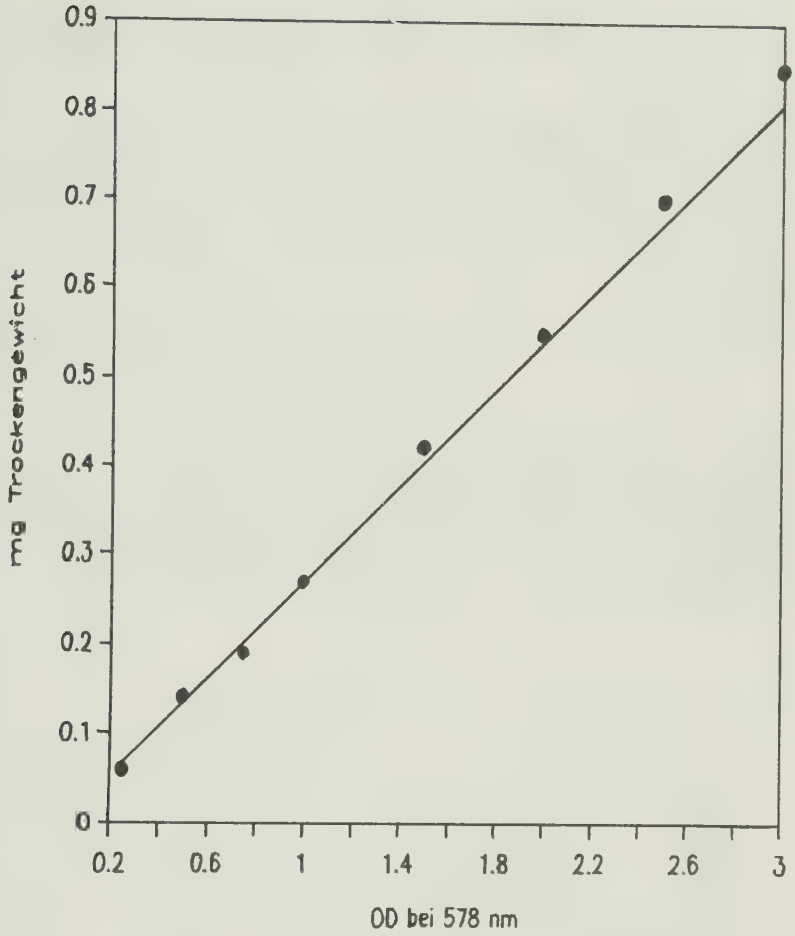

Abb. 10 Bestimmung des Trockengewichts
Je 10 ml Zellsuspension mit unterschiedlichen Zelldichten wurden abfiltriert, 10 Minuten bei 120°C getrocknet und auf der Analysenwaage gewogen.

3.7 REDUKTASEAKTIVITäT

Da keine Siderophore nachgewiesen werden konnten, bestand die Möglichkeit, daß sich die Zellen entweder über eine zellgebundene oder eine ins Medium abgegebene Reduktase mit Eisen versorgen. Zu diesem Zweck wurden zellfreie Überstände von ON Kulturen, die unter verschiedenem Eisenmangel gewachsen waren, untersucht (siehe Punkt 2.12). In NB, NBE (5, 10, 30 mM), NBD (0,5 mM), NB Transferrin (30% Sättigung) und D/M Medium wurden die Stämme 346 und OH 10 bei 37°C angezogen. Die MNNG Mutante OH 15 wurde nur in NB Medium angezogen, da der Stamm unter Eisenmangel und in D/M Medium nicht wächst. Jeder Überstand wurde mit einem Phosphatpuffer (50 mM, pH 8) auf einen pH-Wert von 7 zurücktitriert und dann getestet. In Tab.2 sieht man, daß die zellfreien Überstände der Kulturen eine reduzierende Aktivität aufweisen. Allerdings ist die Aktivität des Kulturüberstandes bei der Kontrolle in NB Medium genauso hoch wie die der Eisenmangelkulturen. Bei der Alb^r Mutante OH 10 zeigten sich die gleichen Werte, wie beim Wildtyp 346

Auch bei Zugabe von 10 µM Fe^{3+} zum D/M Medium konnte keine Reduzierung der Aktivität der Reduktase beobachtet werden. Da die MNNG Mutante OH 15 weder in D/M noch in NBE oder NBD wuchs, wurde dieser Stamm nur in NB und NB + 10 µM Fe^{3+} angezogen. Die Überstände zeigten ebenfalls Reduktase Aktivität, vergleichbar mit der des Wildtyps 346 (siehe Tab.2). Der Nullwert wurde mit NB bzw. D/M Medium eingestellt.

Tab.2 Reduktaseaktivität der Kulturüberstände

Kulturüberstände	OD bei 572 nm nach 30 Minuten 346	OH 10	OH 15
NB (Kontrolle)	0,5	0,5	0,3
NBE (5 mM EDDA)	0,48	0,5	-
NBE (10 mM EDDA)	0,5	0,52	-
NBE (30 mM EDDA)	0,53	0,53	-
NBD (0,5 mM DiP)	0,49	0,5	-
NB-Tf (30 µM Transferrin)	0,5	0,5	0,1
D/M-Medium	0,5	0,48	-
D/M-Medium/Eisen	0.51	0,5	-
NB/Eisen	0,5	0,52	0,3

Die MNNG Mutante OH 15 wuchs nicht in NBE und D/M Medium.

3.8 WACHTUMSFÖRDERUNG

3.8.1 Wachstumsförderung durch Kulturüberstände

Um überprüfen zu können, ob es Chelatoren gibt, die keine Phenolat- bzw. Hydroxamatgruppen enthalten, wurden 2 ml Kulturüberstand von unter Eisenmangel gewachsenen Zellen des Wildtyps 346 (NBE, 30 mM EDDA) zu 18 ml frischem NBE Medium (30 mM EDDA) zupipettiert, mit Zellen angeimpft und bei 37°C inkubiert. Abb.11 zeigt, daß keine signifikante Wachtumssteigerung stattfand.

3.8.2 Wachstumsförderung durch Zellen

Da keine Stimulation des Wachstums durch die Kulturüberstände von unter Eisenmangel gewachsenen Zellen festzustellen war, wurde geprüft, ob es zellgebundene Siderophore gibt. Dazu wurden frisches NBE (30 mM EDDA) Medium mit einer ÜN Kultur des Wildtyps 346 in NBE (30 mM EDDA) zu einer OD von 0,1 angeimpft. Als Kontrolle dienten Zellen, die ÜN in NB gewachsen waren. In Abb.12 sieht man, daß die Wachstumsverläufe fast gleich waren.

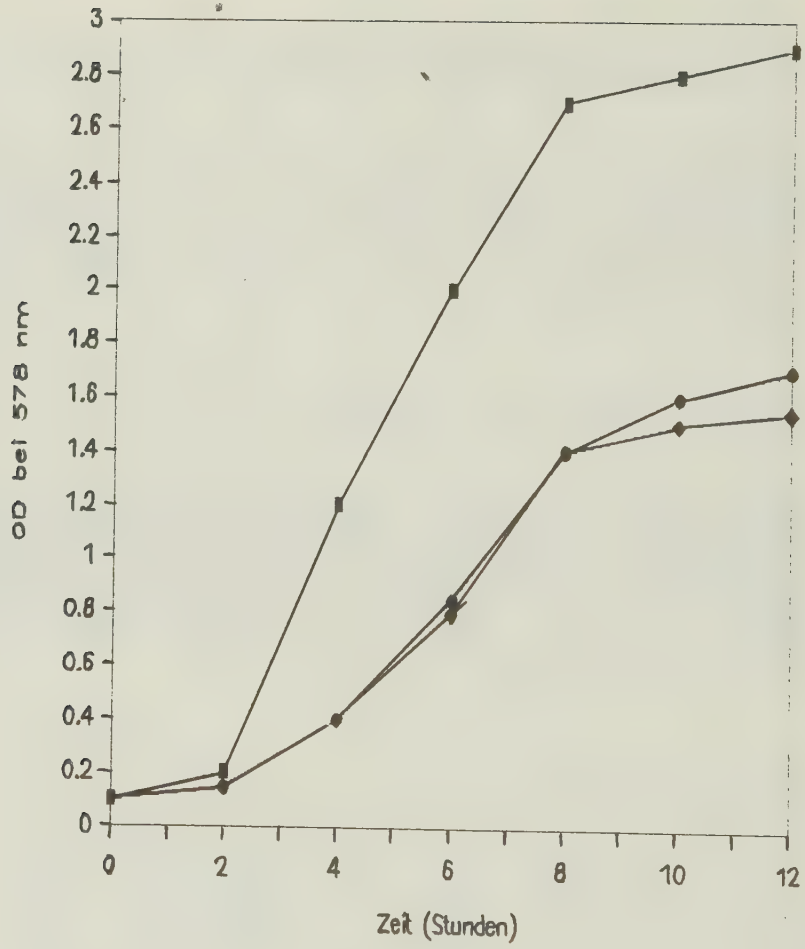

Abb. 11 Wachstum mit Kulturüberständen
18 ml frisches NBE Medium (30 mM EDDA) wurden mit 2 ml Kulturüberstand einer ÜN Kultur in NBE (30 mM) versetzt. Mit dem Stamm 346 wurde das Medium zu einer OD von 0,1 angeimpft. ■ = Kontrolle in NB; X = NBE; ◆ = NBE + Kulturüberstand

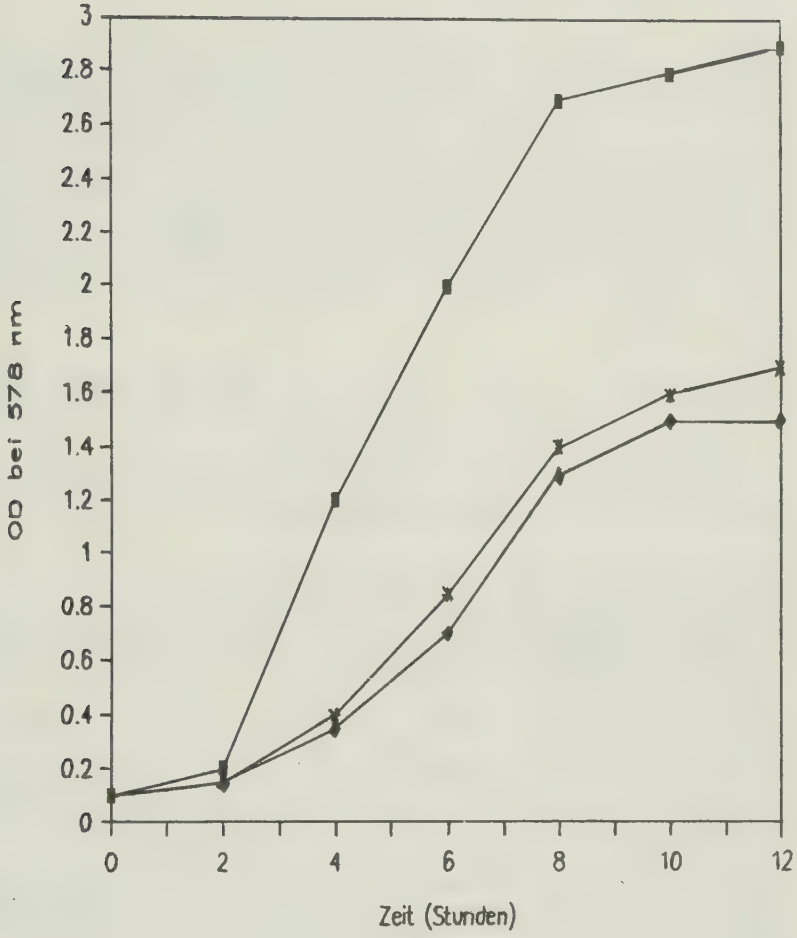

Abb. 12 Wachstum mit Zellen
Frisches NBE (30 mM EDDA) Medium wurde mit einer ON des Wildtyps 346 in NBE (30 mM EDDA) und NB zu einer OD von 0,1 angeimpft.
■ = Kontrolle in NB; † = NBE (30 mM EDDA, NB-ON-Kultur); ◆ = NBE (30 mM EDDA, NBE-ON-Kultur)

3.9 PLATTENDIFFUSIONSTESTS

Da Marcelis (39) und Maskell (41) ein Testsystem entwickelt hatten, mit dessen Hilfe sie Siderophore bei S.aureus nachweisen konnten, versuchte ich dieses Testsystem auf den Wildtyp 346 anzuwenden. Schwierig war es, einen Eisenmangel so zu schaffen, daß die Zellen nicht mehr ohne Zugabe von Siderophoren bzw. Eisen wachsen konnten. Dies gelang im NB Medium nur bei einer EDDA Konzentration von 44 mM. Dies ist die größte Menge an EDDA, die sich gerade noch löst. In 100 ml NB Medium wurde die entsprechende Menge EDDA gegeben und mit 10 ml 10 N NaOH versetzt, damit das EDDA in Lösung geht. Anschließend wurde das Medium mit 12 N HCl wieder auf einen pH-Wert von 7 zurücktitriert, der Agar zugegeben und autoklaviert.

Einfacher war es bei D/M Agar, bei dem eine EDDA Konzentration von 200 µM ausreichte, um einen Wachstumsstop zu erhalten. Es wurde ermittelt, daß eine Zellzahl von 10^3 bis 10^4 Zellen pro Platte optimal war. Je höher die Zelldichte wurde, um so stärker war das Hintergrundwachstum, so daß auch bei den sehr hohen EDDA Konzentrationen das Wachstum nicht unterbunden werden konnte.

Nachdem die Zellen 10-15 Minuten eingetrocknet waren, wurden Löcher in den Agar gestanzt und mit 20-25 µl der zu testenden Substanz bzw. Überständen versetzt. Nach eintägiger Inkubation war ein Wachstum nur mit Ammonium Eisen(II) Sulfat zu erkennen. Weitere Reaktionen auf Siderophore bzw. Zellsuspensionen waren erst am darauffolgenden Tag zu beobachten. Da das EDDA nicht ausschließlich Fe^{2+} -Ionen, sondern auch andere zweiwertige Kationen komplexiert, wurden als Kontrolle 20 µl einer Spurenelementlösung zugegeben. Im Falle des NBE Mediums erfolgte kein Wachstum, d.h. hier handelte es sich eindeutig um einen Eisenmangel. Auf den D/M Platten hingegen erfolgte ein Wachstum, jedoch war der Wachstumshof mit 10 mm Durchmesser deutlich geringer als mit 10 µg $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ (zwischen 19 und 22 mm). Das Wachstum bei Zugabe der Spurenelementlösung war abhängig von der Konzentration. Sobald diese um das 100 fache erniedrigt wurde, zeigte sich kein Wachstum. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Maskell (41), der die Spurenelementlösung nur in der zuletzt genannten, 100 fach verminderten Konzentration anbot.

Ein entscheidendes Ergebnis jedoch war die Tatsache, daß bei der Zugabe von Zellsuspensionen nach 2 Tagen ein Wachstumshof zu erkennen war. Dies zeigte sich aber nicht nur beim Wildtyp 346, sondern auch bei der Alb^r Mutante OH 15 und bei der MNNG Mutante OH 10. Letztere konnte nur in TY Medium angezogen werden. Die beiden anderen Stämme wurden auch in NBE (30 mM) vorgezogen.

Leider zeigte sich kein Wachstum bei der Zugabe des zellfreien Überstandes, so daß hier eine Ausscheidung von Siderophoren, wie es Marcelis und Maskell beschrieben

hatten, nicht nachgewiesen werden konnten.

Da es denkbar war, daß zellgebundene Chelatoren eine Rolle spielen, wurde ein Aufschluß von Zellen nach Snow (69) gewählt. Diese Methode wird für die Isolierung der zellgebundenen Mycobactine angewandt. Aber auch dieses Experiment konnte keinen Erfolg bei der Vermittlung des Wachstums unter Eisenmangel erzielen.

Um zu überprüfen, ob das Pigment von S.aureus die Funktion eines Chelators besitzt, wurde das Pigment, entsprechend der Beschreibung unter Punkt 2.6, isoliert und im Plattendiffusionstest getestet. Aber auch dieses Experiment zeigte keine Stimulierung des Wachstums auf NBE oder D/M Platten.

3.10 TRANSPORTSTUDIEN

3.10.1 Zeitabhängiger FC Transport

In Abb.13 ist zu sehen , daß der Ferrichrom Transport innerhalb eines Zeitintervalls von ca. 3 bis 25 Minuten linear verläuft. Alle weiteren Transportmessungen wurden deshalb in diesem zeitlichen Bereich durchgeführt.

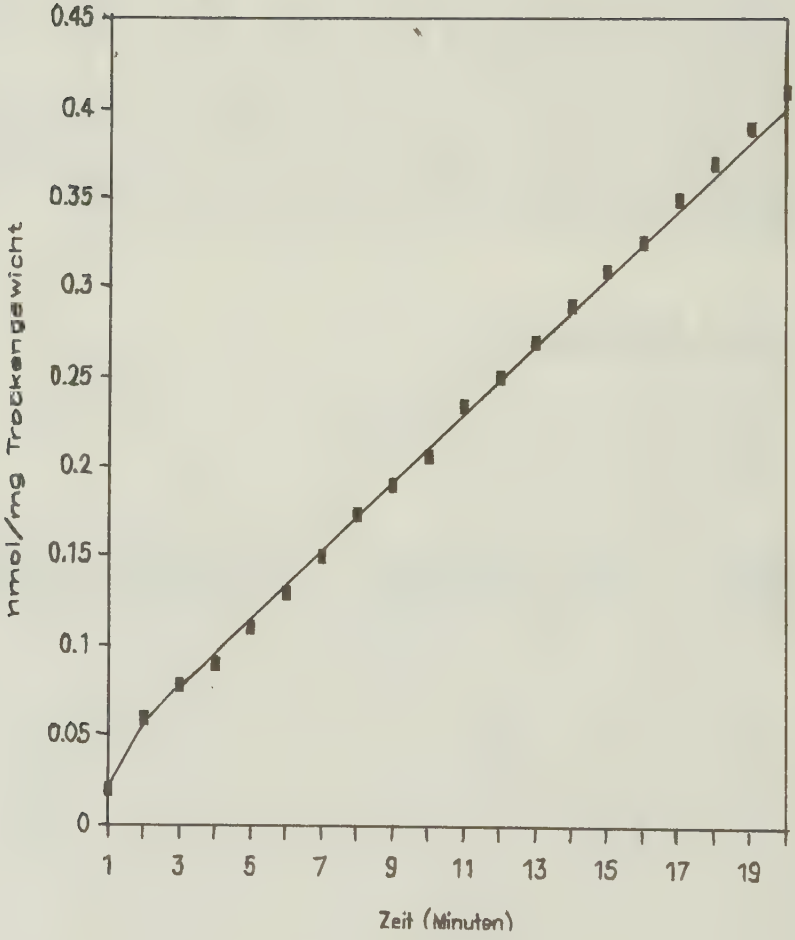

Abb. 13 Zeitabhängiger Ferrichromtransport
Der Stamm 346 wurde in TY angezogen, geerntet, in D/M-Medium gewaschen und resuspendiert. Markiertes Ferrichrom wurde in einer Konzentration von 0,5 µM zugegeben. Nach jeweils einer Minute wurden Proben entnommen und gemessen.

3.10.2 Energieabhängiger FC Transport

Zur Untersuchung der Energieabhängigkeit wurden mehrere Atmungsgifte eingesetzt. DNP unterbindet die Kopplung zwischen oxidativer Phosphorylierung und Elektronen Transport. Arsenat hemmt die Substratketten Phosphorylierung. Cyanid bindet Eisen und blockiert somit die Cytochromoxidase. Bei der Zugabe von DNP sieht man in Abb.14 , daß im Gegensatz zum E.coli K12 Wildtyp W3110 eine nur sehr geringe Hemmung der Aufnahme erfolgt. Nach 5 stündiger Vorinkubation mit dem Entkoppler, sank die Transportrate um ca. 80%, wobei die Zellzahl konstant blieb (Abb.15)

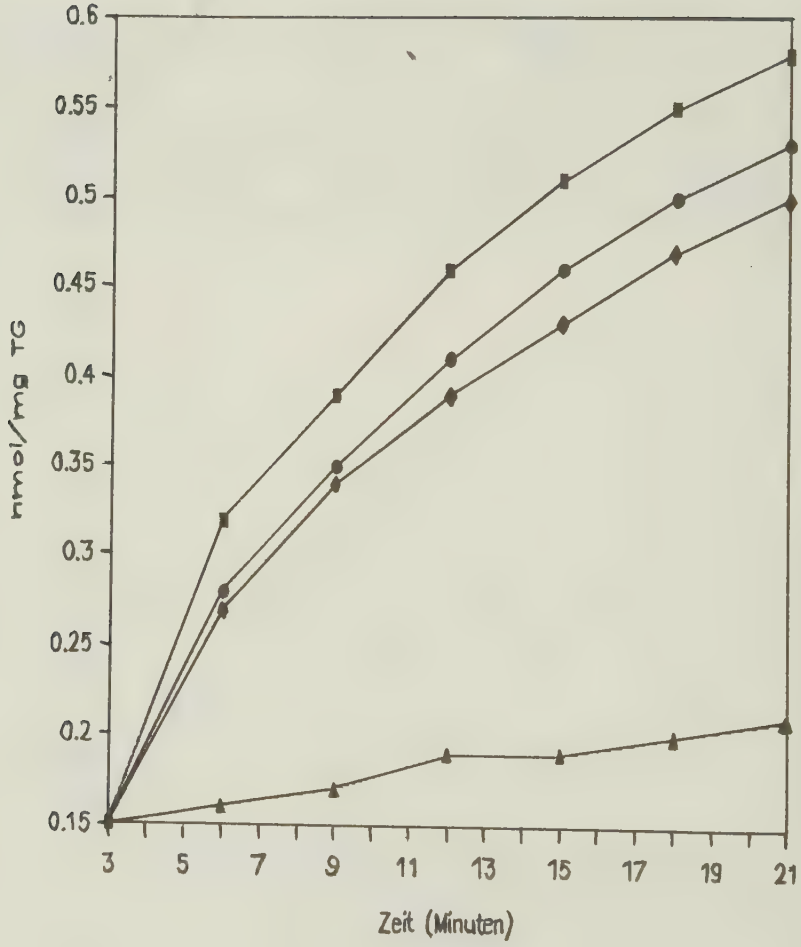

Abb. 14 Ferrichrom Transport mit DNP
Die Stämme 346 und E.coli K12 W3110 wurden in TY angezogen, bei einer OD von 0,5 geerntet, gewaschen und in D/M-Medium resuspendiert. Zu Beginn des Transports wurde 1 mM DNP zupipettiert. Kontrollen: † = W3110; ■ = 346; + DNP: ▲ = W3110; ◆ = 346

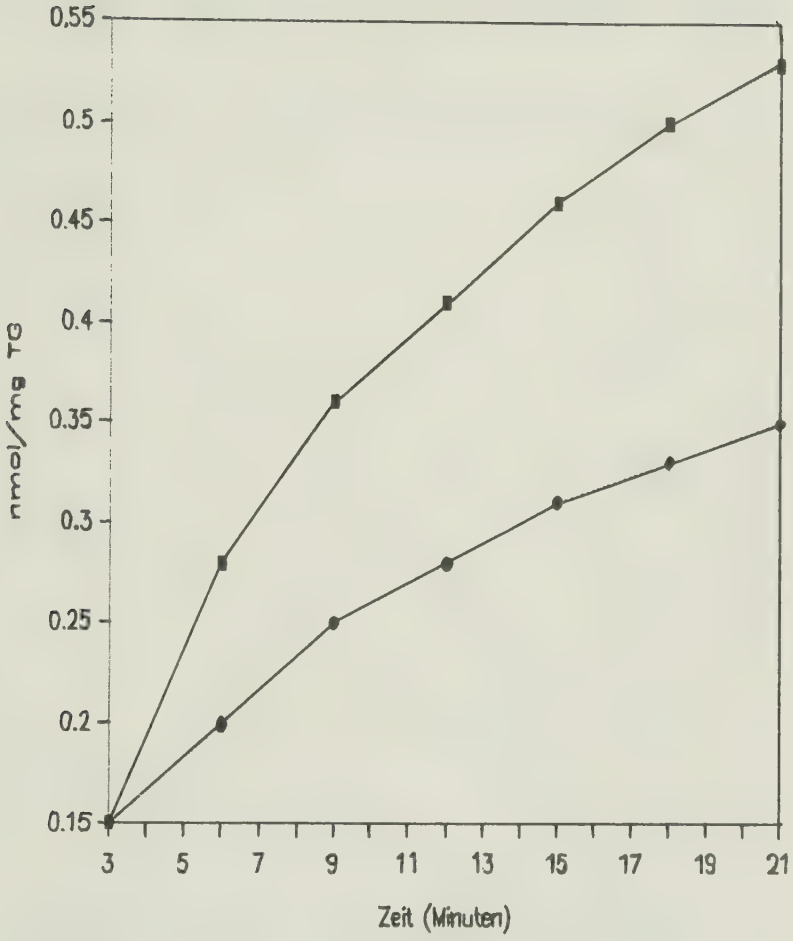

Abb. 15 Ferrichrom Transport mit DNP Vorinkubation
Der Stamm 346 wurde in Ty angezogen, bei einer OD von ca. 0,5 geerntet, gewaschen und in D/M Medium resuspendiert. 5 Stunden vor der Zugabe des markierten Ferrichroms wurde 1 mM DNP zupipettiert. ■ = 346 (0 Minuten); ♦ = 346 (5 Stunden)

Auch bei der Zugabe von Arsenat (Abb.16) bzw. Cyanid (Abb.17) zeigte sich eine deutliche Abnahme der Transportrate erst bei hohen Konzentrationen (50, 100 mM).

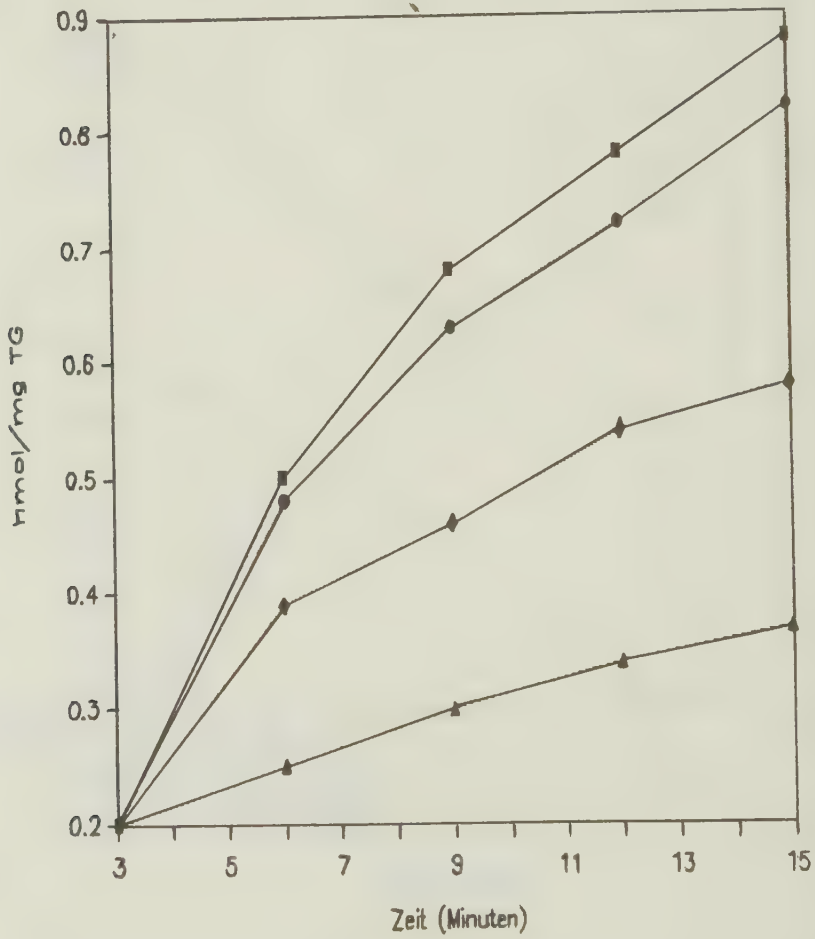

Abb. 16 Ferrichrom Transport mit Arsenat
Der Stamm 346 wurde in TY angezogen, bei einer OD von ca. 0,5 geerntet, gewaschen und in D/M Medium resuspendiert. Bei 0 Minuten wurden je 50 bzw. 100 mM Arsenat zugegeben.
■ =Kontrolle; ▼ = + 10 mM; ◆ = + 50 mM;
▲ = + 100 mM Arsenat

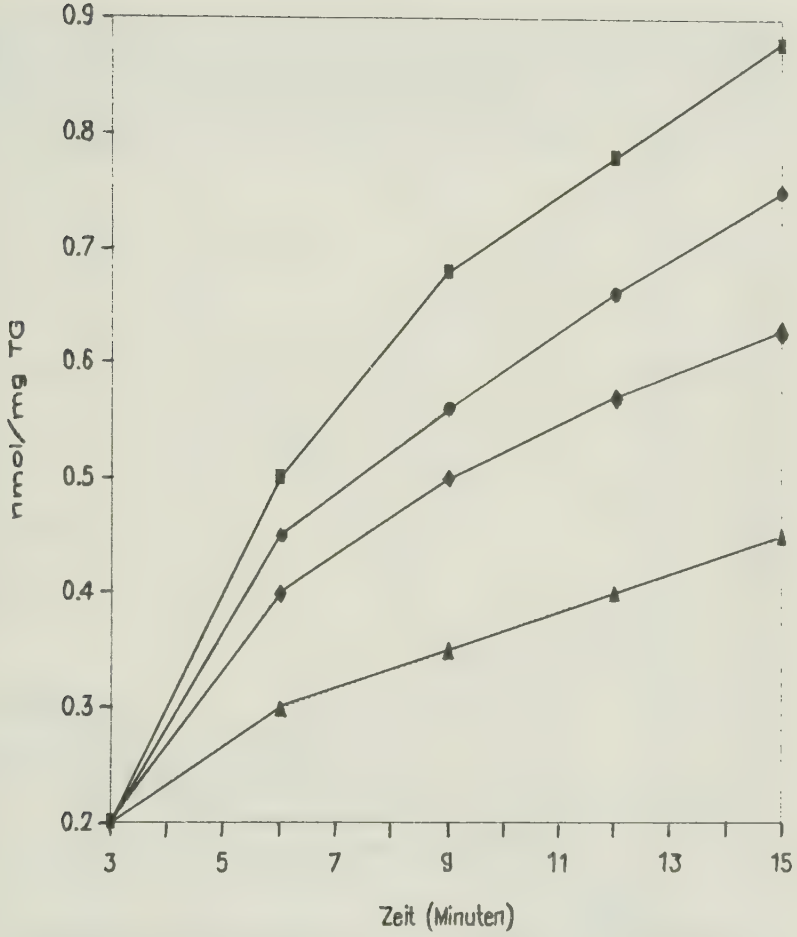

Abb. 17 Ferrichrom Transport mit Cyanid
Der Stamm 346 wurde in TY angezogen, bei einer OD von ca. 0,5 geerntet, gewaschen und in D/M Medium resuspendiert. Bei 0 Minuten wurden je 10, 50 bzw. 100 mM Cyanid zugegeben. ■ =Kontrolle; ✝ = + 10 mM; ◆ = + 50 mM; ▲ = + 100 mM Cyanid

3.10.3 Ferrichrom Transport bei OH 5, OH 10 und OH 15

Von den Alb^r Mutanten, wurden 2 Stämme ausgewählt. Die erste Mutante OH 5 war $Hydroxamat^+$, die zweite war $Hydroxamat^-$ (OH 10). In Abb.18 sieht man, daß beide Alb^r Mutanten kein, bzw. nur sehr langsam Eisen aufnehmen. Ein ähnlich verlaufender Transport zeigte auch die MNNG Mutante OH 15.

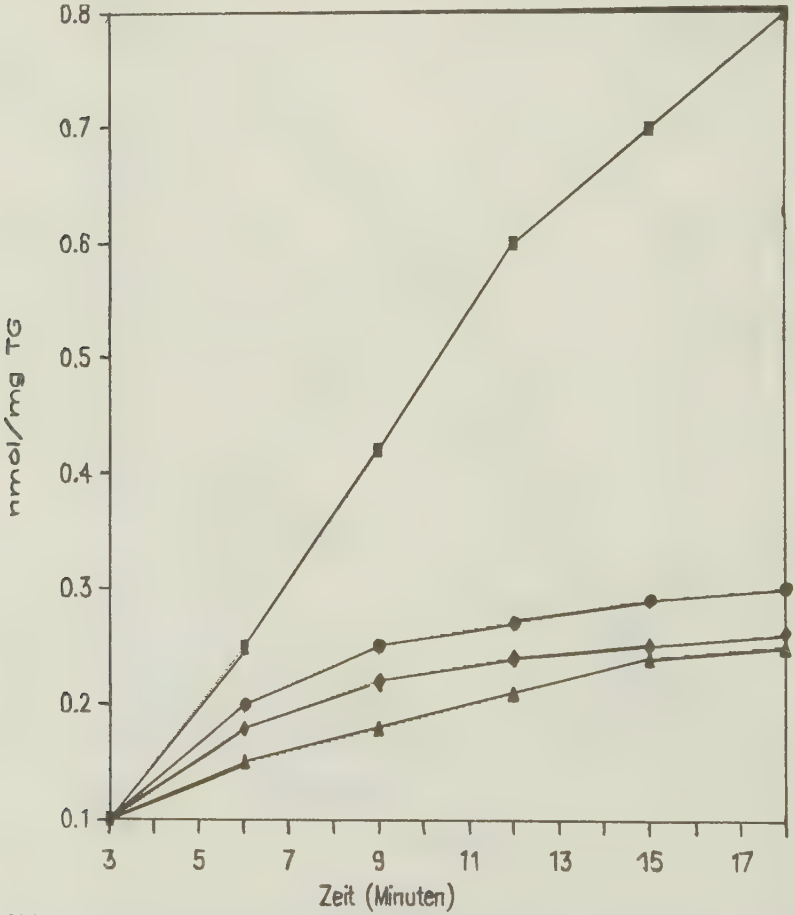

Abb. 18 Ferrichrom Transport bei OH 5, OH 10 und OH 15
Die Stämme OH 5, OH 10, OH 15 und 346 wurden in TY angezogen, nach 4 Stunden geerntet, gewaschen und in D/M Medium resuspendiert.
■ = Kontrolle (346); † = OH 5; ◆ = OH 10; ▲ = OH 15

3.10.4 Transferrin Transport

Um festzustellen, ob es einen aktiven Transport des an Transferrin gebundenen Eisens in die Zelle gibt, wurden Transportkinetiken bei den Stämmen 346, OH 10 und OH 15 aufgestellt. Abb.19 zeigt, daß weder beim Wildtyp noch bei den Mutanten eine Aufnahme zu beobachten ist.

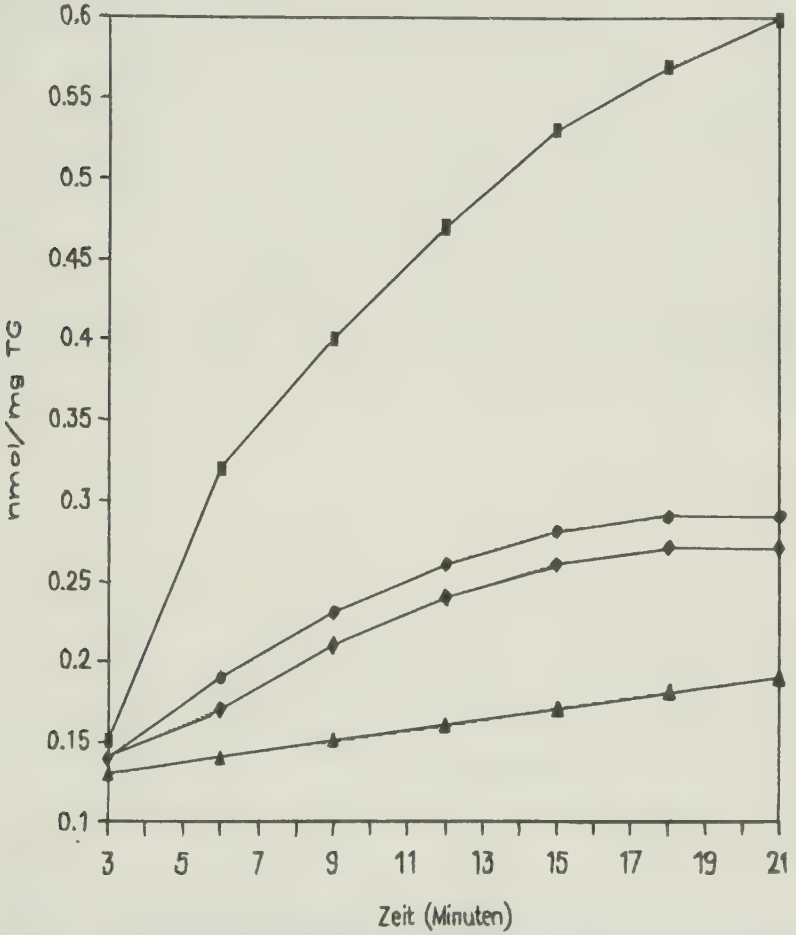

Abb. 19 Transferrin Transport
Die Stämme 346, OH 10, und OH 15 wurden in TY angezogen, nach 4 Stunden geerntet, gewaschen und in D/M Medium resuspendiert.
■ = Kontrolle (346, FC); + = 346, ◆ = OH 10; ▲ = OH 15

3.10.5 Km-Wert Bestimmung

Um zeigen zu können, daß die Aufnahme des Ferrichroms keinen Diffusionsprozeß darstellt, sondern die Zellen tatsächlich über einen Transportmechanismus verfügen, bei dem das Subtrat einen Rezeptor benutzt, wurde zunächst eine von der Konzentration abhängige Kinetik durchgeführt. Hierbei wurden nach 5 und 10 Minuten Proben entnommen und deren Radioaktivität bestimmt. Die Konzentrationen des Ferrichroms betrugen 0,2 µM; 0,4 µM; 0,8 µM; 1 µM; 1,5 µM; 2 µM; 5 µM; 7 µM und 10 µM. Bei dem Vorhandensein von Rezeptoren muß eine Sättigungskinetik auftreten, da der Rezeptor ab einer bestimmten Konzentration ständig besetzt ist und somit die Menge des Ferrichroms keinen limitierenden Faktor mehr darstellt. Das heißt, daß ab einer gewissen Konzentration von Ferrichrom die Aktivität der Zellen nur noch unwesentlich zunehmen darf. Abb.20 und Abb.21 zeigen die Ergebnisse dieser Versuche. Um den Km-Wert des Transportsystems beschreiben zu können, wurde ein Line Weaver Burk Diagramm aufgestellt. Dazu wurde in einem Koordinatensystem 1/s gegen 1/v aufgetragen, wobei s die Konzentration des Ferrichroms und v die Aktivität in pmol/mg TG * Minute darstellt. Der so ermittelte Wert für das Ferrichrom liegt bei ca. 1 µM.

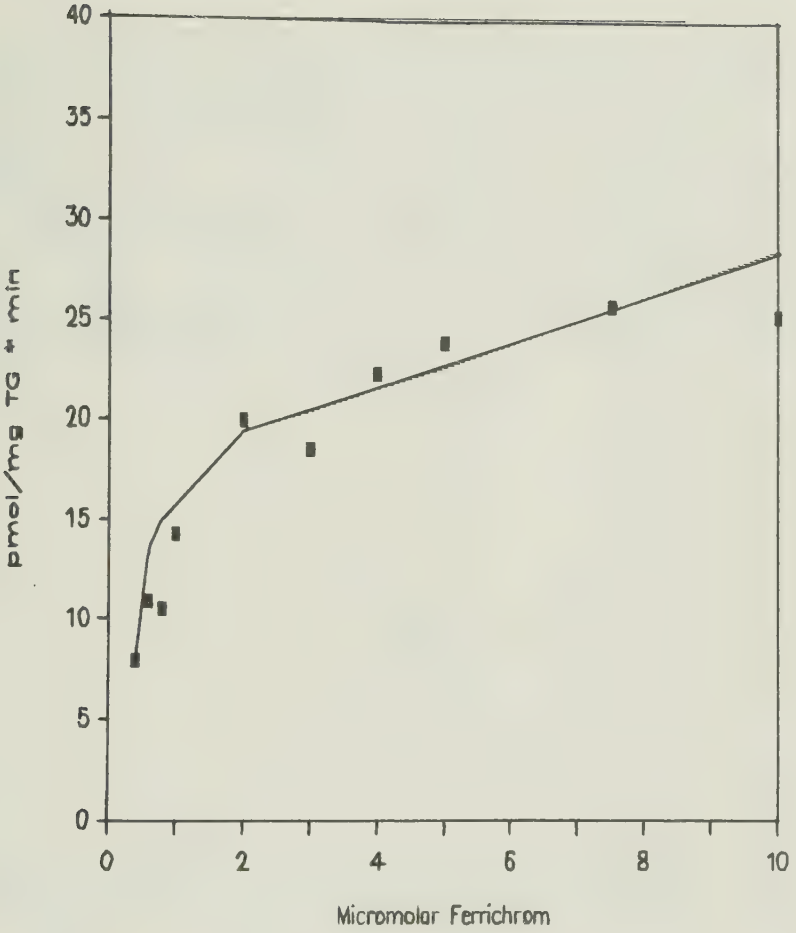

Abb. 20 Sättigungskinetik des Ferrichromtransports
Der Stamm 346 wurde in TY angezogen, nach 4 Stunden geerntet, gewaschen und in D/M Medium resuspendiert. Verschiedene Siderophor Konzentrationen wurden eingesetzt: 0,2 µM; 0,4 µM; 0,8 µM; 1 µM; 1,5 µM; 2 µM; 5 µM; 7,5 µM und 10 µM

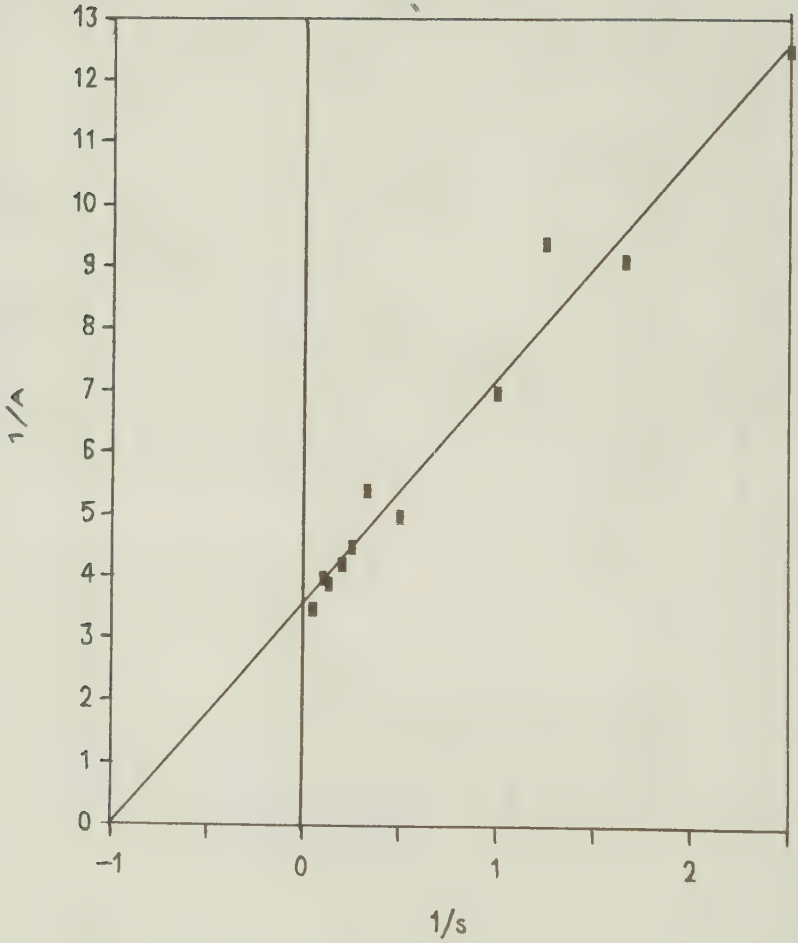

Abb. 21 Linewaever Burk Diagramm
Die Werte der Sättigungskinetik wurden in ein Line Weaver Burk Diagramm eingezeichnet

3.10.6 Hemmung des FC Transports

Um einen weiteren Hinweis zu erhaltenm ob die getesteten Hydroxamate das gleiche Transportsystem benutzen, wurde versucht, mit 2 Siderophoren eine Hemmung der Aufnahme zu erreichen. Zunächst wurde unmarkiertes Ferrioxamin B angeboten. Nach 5 Minuten wurde ^{55}Fe markiertes Ferrichrom zugegeben. Geht man davon aus, daß es ein nur Transportsystem gibt, müßte die Menge an aufgenommenen radioaktiven Eisens sinken, da beide Siderophore um das gleiche Transportsystem konkurrieren. Bei unterschiedlichen Transportsystemen dürfte die Radioaktivität gleich bleiben. Abb.22 zeigt, daß bei Zugabe von Ferrichrom (Kontrolle), Ferrioxamin B und enantio Ferrichrom die erwartete Verminderung der Radioaktivität auftrat, wohingegen bei der Zugabe von Coprogen keine, bzw. eine nur sehr geringe Abnahme der Aktivität zu beobachten war.

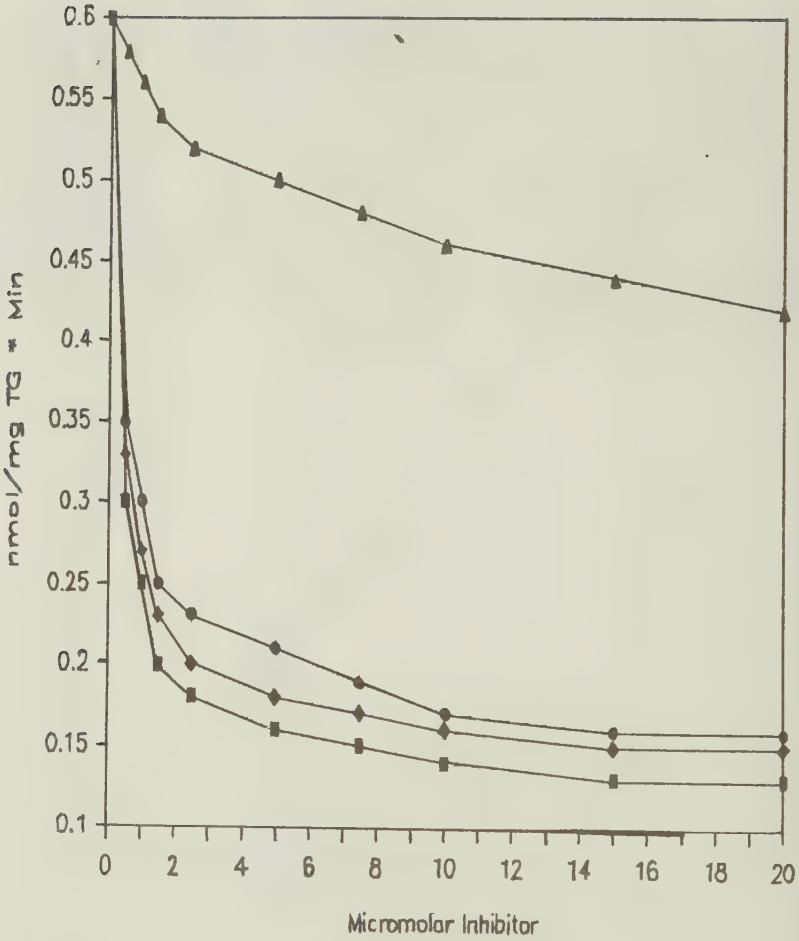

Abb. 22 Hemmung des FC Transports
5 Minuten vor Zugabe des markierten FC wurden steigende Konzentrationen eines unmarkierten, Fe-beladenen Chelators angeboten und anschließend die Transportrate bestimmt. ■ = FC (Kontrolle); ♦ = + FOX B; † = + enantio-FC; ▲ = + Coprogen

3.10.7 Pulse chase Experiment mit FC

Um herauszufinden, ob das radioaktive Eisen innerhalb der kurzen Zeit des Transports in Biomoleküle eingebaut wird, wurde versucht, das in die Zellen aufgenommene oder an die Zellen gebundene radioaktive Eisen durch die Zugabe von Ferrichrom bzw Coprogen wieder freizusetzten. Wenn das Eisen noch nicht in die Zelle eingebaut ist, wenn also das Ferrichrom noch an der Membran oder in der Zelle sitzt, muß es möglich sein, durch einen Überschuß an kaltem Ferrichrom, den radioaktiven Chelator zu verdrängen.

Eine andere Fragestellung konnte mit diesem Experiment ebenfalls untersucht werden. Da das Coprogen bis zu einem 40 fachen Überschuß die Transportrate des Ferrichroms nur unwesentlich verminderte (nur in höheren Konzentrationen gelang es den Ferrichrom Transport zu senken), wurde untersucht, ob das Coprogen das Ferrichrom zu verdrängen vermag. In Abb.23 sieht man, daß das Coprogen tatsächlich in der Lage ist, das FC zu verdrängen. Auch bei der Zugabe von kaltem Ferrichrom erkennt man, daß die Aktivität der Zellen sinkt und zwar mit ungefähr der gleichten Rate wie beim Coprogen.

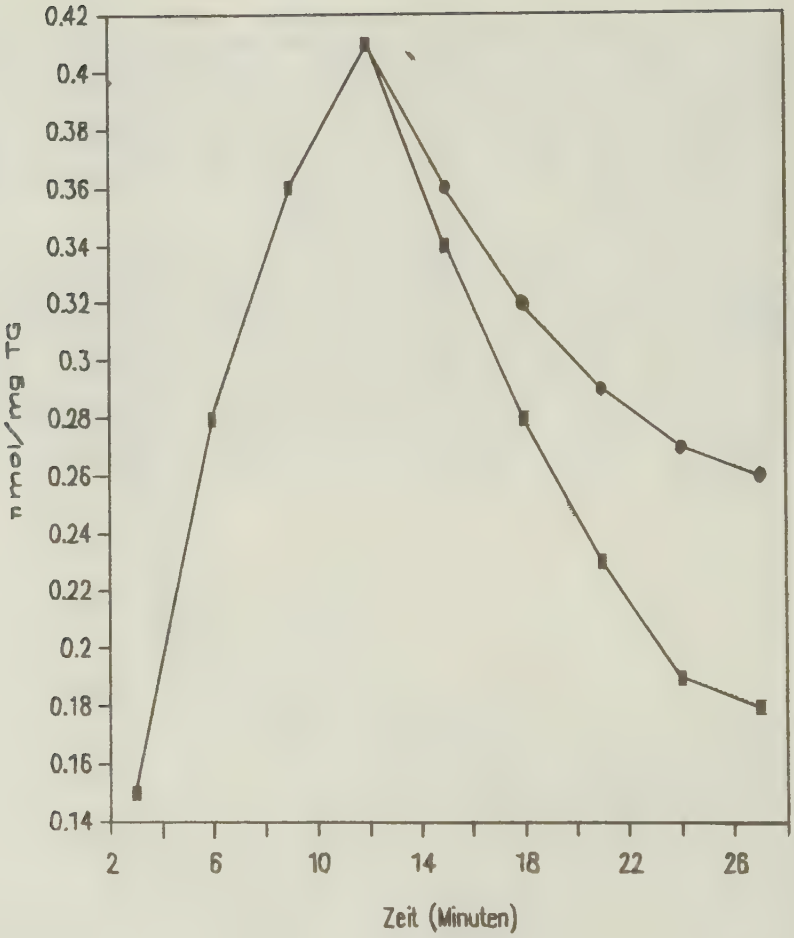

Abb. 23 Pulse chase Experiment mit kaltem Ferrichrom
Der Stamm 346 wurde in TY angezogen, in D/M Lösung gewaschen und resuspendiert. Markiertes Ferrichrom wurde in einer Konzentration von 0,1 µM angeboten. Nach 12 Minuten wurden 10 µM FC bzw.Coprogen zugegeben. ■ = + FC; + = + Coprogen

3.10.8 Fe-Citrat Transport

Wie die Abb.24 zeigt, wird Fe-Citrat nur in sehr geringem Ausmaß aufgenommen. Allerdings ist bei der Alb^r Mutante OH 10 die Aufnahme größer als die des Ferrichrom Transports.

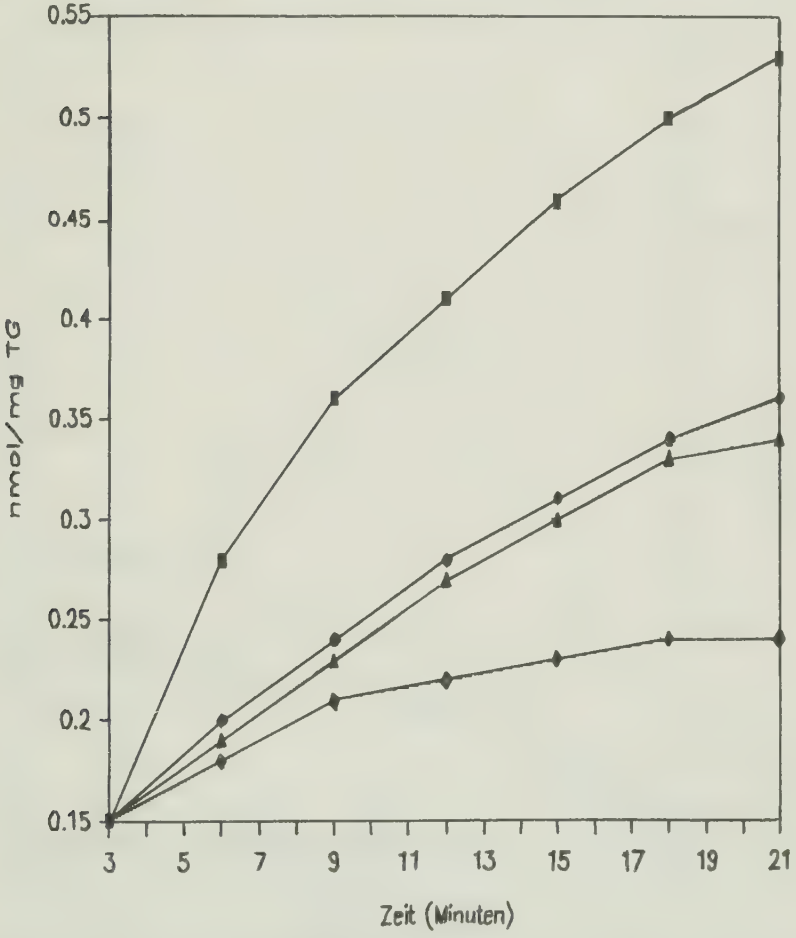

Abb. 24 Fe-Citrat Transport
Die Stämme 346 und OH 10 wurden in TY angezogen, in D/M Lösung gewaschen und resuspendiert. Markiertes Citrat wurde in einer Konzentration von 10 µM angeboten.
■ = 346 (FC Kontrolle); + = 346 (Cit);
◆ = OH 10 (FC); ▲ = OH 10 (Cit)

3.10.9 Aerobactin und RA Transport

Abb.25 zeigt, daß Aerobactin und Rhodutorulasäure nicht transportiert werden. Die Transportraten stimmen mit denen des Ferrichrom Transports bei der Alb^r Mutante OH 10 ungefähr überein.

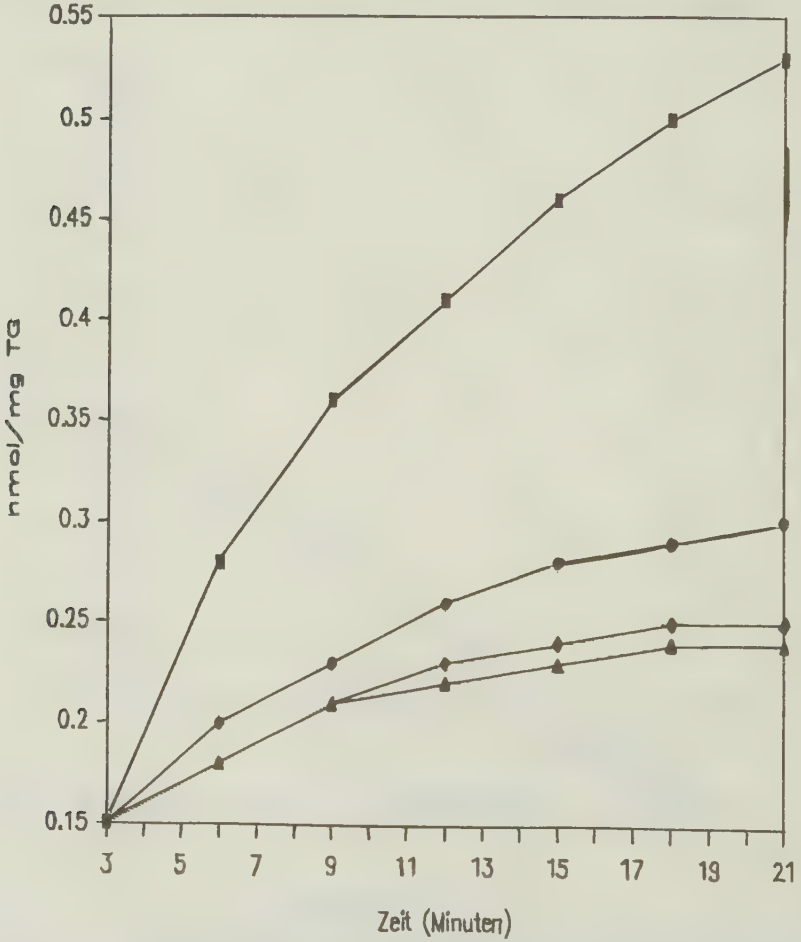

Abb. 25 Aerobactin und RA Transport
Die Stämme 346 und OH 10 wurden in TY angezogen, in D/M Lösung gewaschen und resuspendiert. Aerobactin und RA wurden in einer Konzentration von 0,5 µM angeboten.
■ = 346 (FC Kontrolle); ● = 346 (Aerobactin); ▲ = 346 (RA); † = OH 10 (FC)

3.10.10 ^{14}C-Coprogen Transport

In Abb.26 sieht man, daß die Transportraten des FC und des Coprogens ungefähr gleich sind. Durch die relativ geringe Markierung des Coprogens mußte das Ansatzvolumen vergrößert werden. Statt 1 ml wurden 10 ml verwendet, um je 1 ml Probe entnehmen zu können (bei Ferrichrom 0,1 ml).

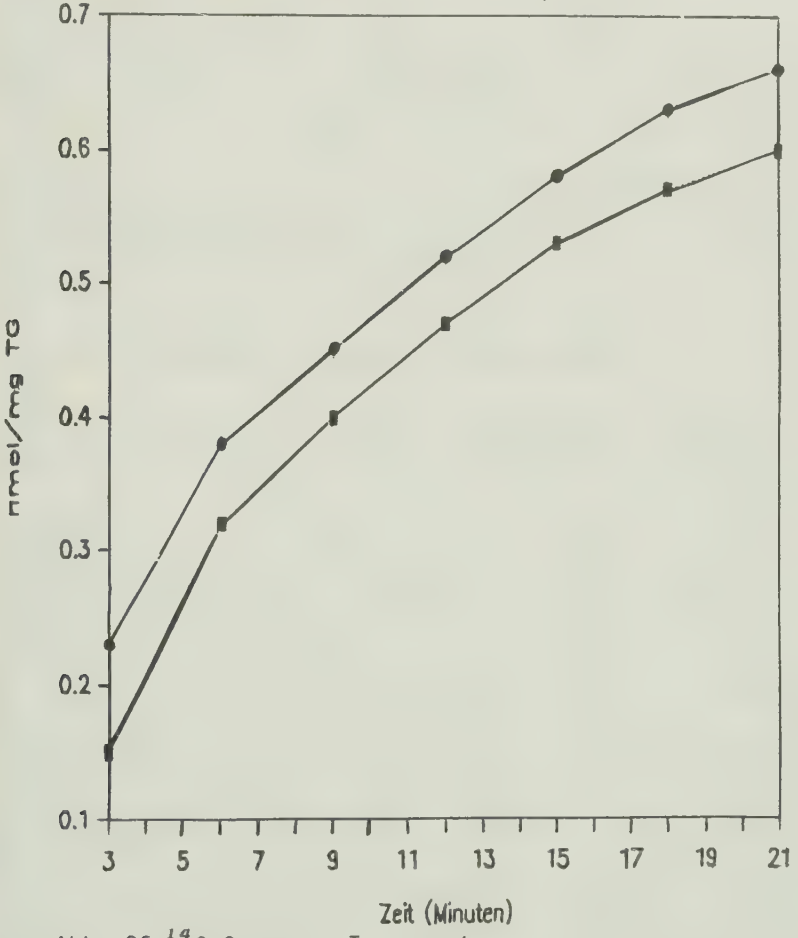

Abb. 26 ^{14}C-Coprogen Transport
Der Stamm 346 wurde in TY angezogen, in D/M Lösung gewaschen undresuspendiert. Coprogen wurde in einer Konzentration von 1 µM angeboten. † = 346 (FC Kontrolle); ▮ = 346 (Coprogen)

KAPITEL 4. DISKUSSION

4.1 EISENMANGEL UND MUTAGENESEN

Beim Wachstum in NBD zeigte sich, daß der Wildtyp 346 durch Konzentrationen ab 1 mM Dipyridyl geschädigt wird. Dahingegen trat eine Schädigung bei der Verwendung von EDDA nicht auf. Das Wachstum des Wildtyps 346 wurde bei einer Konzentration von 30 mM um ca. 50% gehemmt.

Es wurden Mutanten isoliert und geprüft, ob diese unter Eisenmangel wachsen können. Zunächst wurden 144 Alb^r Mutanten isoliert. Wenn das Ferrichromaufnahmesystem das einzige,spezifische Eisentransportsystem von S.aureus ist, ist zu erwarten, daß durch den Verlust des Transportsystems keine Wachstumsstimulierung mehr unter Eisenmangel erfolgen kann. Alle Mutanten besaßen einen stabilen Phänotyp. Es konnten verschiedene Formen der Resistenz beobachtet werden. Ca.20% der Alb^r Mutanten konnten auf Ferrichrom wachsen. Die Mutante OH 5 stellt davon einen Vertreter das. Der andere Teil der Alb^r Mutanten, wie z.B. die Mutante OH 10, zeigte kein Wachstum mit Ferrichrom mehr. Diese Mutante wurde auch auf ihr Wachstumsverhalten in NBE (30 mM EDDA) geprüft. Hier zeigte sich kein Unterschied zum Wildtyp 346.

Auch bei der Zugabe von Desferrioxamin B, das zum NB Medium zugegeben wurde, um das Eisen zu binden, geriet die Mutante OH 10 nicht unter Eisenmangel, so daß davon ausgegangen werden kann, daß es ein weiteres Transportsystem geben muß, mit dem sich S.aureus mit Eisen versorgen kann. Zu diesem Zweck wurden aus den Stämmen 346 und OH 10 MNNG Mutanten isoliert, die auf NBE (5 mM EDDA) nicht mehr wachsen konnten. Ich erhielt mit verschiedenen Methoden zunächst 27 Mutanten, die weder auf NBE (5 mM EDDA) noch auf NBD (0,2 mM DiP) wachsen konnten, wohl aber auf TY und NB Medium. Diese Mutanten erwiesen sich allerdings als sehr instabil. Nur 2 Mutanten (OH 15 und OH 20) aus der Ampicillinanreicherung (2.9.4 und 3.3.3) zeigten auch nach längerer Zeit kein Wachstum in NBE (5 mM EDDA). Die Mutante OH 15 wurde aus dem Wildtyp 346 isoliert, die Mutante OH 20 aus der Alb^r Mutante OH 10. Allerdings wachsen diese Mutanten auf TY und NB Platten zu kleineren Einzelkolonien heran und waren Alb^r. Wachstumsverläufe in flüssigen NB und TY Medium bestätigten diese Beobachtungen. Insofern könnte ein genereller Defekt im Stoffwechsel die Ursache für das langsamere Wachstum in TY und NB Medium sein. Dadurch wäre auch das stark verminderte Wachstum in NBE (5 mM EDDA) zu erklären.

Im Serum wuchsen der Wildtyp 346 und die Alb^r Mutante OH 10 gleich gut. Nur die MNNG Mutante OH 15 zeigte ein stark verlangsamtes Wachstum. Ein eisenlimitiertes Wachstum konnte

auch mit Transferrin, Ovotransferrin und Conalbumin beobachtet werden. Die Konzentrationen der Eisenbindeproteine lagen wesentlich unter der des EDDAs. So konnte man z.B. durch Zugabe von 30 µM Transferrin zum NB Medium eine starke Wachstumshemmung beobachten. Der Sättigungsgrad des Transferrins mit Eisen betrug im NB Medium ca.16%. Durch eine vorangegangene Beladung des Transferrins mit Eisen konnte diese Hemmung teilweise aufgehoben werden, ohne jedoch die Wachstumsverläufe in reinem NB Medium zu erreichen. Die Alb^r Mutante OH 10 zeigte den gleichen Wachstumsverlauf wie der Wildtyp 346. Die MNNG Mutante OH 15 wuchs langsamer in NB-Transferrin Medium, wurde allerdings durch die höhere Sättigung des Proteins mit Eisen ebenfalls in ihrem Wachstum weniger stark gehemmt. Dies war ein weiteres Indiz dafür, daß die MNNG Mutangenese keinen zentralen Versorgungsmechanismus der Zellen mit Eisen traf, sondern ein genereller Stoffwechseldefekt vorliegt. Die Bindung des Eisens an die Proteine ist ein reversibler Vorgang. Insofern läßt sich auch die Wachstumssteigerung bei höheren Eisensättigungsgraden erklären.

4.2 SIDEROPHORPRODUKTION UND WACHSTUMSFÖRDERUNGEN

Siderophore, die Hydroxamat- oder Phenolatgruppen enthalten, konnten nicht nachgewiesen werden. Um mögliche Siderophore zu entdecken, die keine Hydroxamat- bzw. Phenolatgruppen enthalten, wurden Fütterungsversuche unternommen. Allerdings zeigten die Kulturüberstände von unter Eisenmangel gewachsenen Zellen keine wachstumssteigernde Aktivität bei den Fütterungsversuchen. Auch Zellen, die vorher unter Eisenmangel gewachsen waren, wuchsen nicht stärker als die Zellen, die in TY angezogen wurden.

Im biologischen Testsystem zum Nachweis von Siderophoren wurde folgendes festgestellt: Zum einen gab es, wie Marcelis (39) und Maskell (41) beobachtet hatten, eine Wachstumsstimulierung bei Zugabe von Zellsuspensionen. Mit zellfreien Überständen jedoch war die Stimulierung nicht zu beobachten. Insofern muß den Autoren widersprochen werden, die behauptet hatten, daß Siderophore ins Medium ausgeschieden werden. Zumindest kann ich dies bei dem Wildtyp 346 ausschließen. Zellen, die mit Ultraschall aufgebrochen wurden, zeigten zwar einen Wachstumshof, jedoch konnte man diesen Faktor nicht näher identifizieren. Weder nach der Aufschlußmethode von Snow (69) noch mit dem isolierten Pigment (40) konnte ein Wachstumshof beobachtet werden.

4.3 PLATTENDIFFUSIONSTEST ZUR WACHSTUMSSTIMULIERUNG MIT HYDROXAMATEN

Bei den Plattendiffusionstests in NBE (5 mM EDDA) zeigte sich, daß das Ferrichrom Transportsystem relativ unspezifisch ist. So konnten mit fast allen getesteten Hydroxamaten Wachstumshöfe beobachtet werden. Ausnahmen waren das Aerobactin, die Rhodotorulasäure und das Ferrithiocin. Mit Enterochelin, einem Vertreter der Phenolatfamilie, konnte ebenfalls kein Wachstumshof beobachtet werden. Da auch die Desferri-Formen von Siderophoren bei der Alb^r Mutante OH 10 keine Wachstumshemmung zeigte, kann dies als weiteres Indiz betrachtet werden, daß es noch ein anderes, spezifisches Eisenaufnahmesystem von S.aureus gibt.

Das Aufnahmesystem von Fe-Citrat kann als weiteres, vom Ferrichromaufnahmesystem unabhängiges, Eisentransportsystem angesehen werden. Sowohl der Wildtyp 346 als auch die Alb^r Mutante OH 10 zeigten mit Fe-Citrat einen Wachstumshof. Zugabe von Citrat allein hatte keine Auswirkung auf das Wachstum unter Eisenmangel.

4.4 TRANSPORTVERSUCHE

Bei den Transportversuchen fiel auf, daß bei der Untersuchung der Energieabhängigkeit sehr viel Arsenat bzw. CN^- benötigt wurde, um eine Abnahme der Transportrate beobachten zu können. Dies läßt sich allerdings dadurch erklären, daß die D/M Lösung viel Phosphat enthält, und somit der PO_4^- Antagonismus des Arsenats hinfällig wird. Allerdings zeigte sich bei dem Zusatz von DNP, daß die Staphylococcen, im Vergleich zu E.coli , weniger empfindlich gegenüber dem DNP sind. Das Vorhandensein eines Transportsystems spricht gegen eine einfache Diffusion. Da bei höheren Konzentrationen der Atmungsgifte die Transportrate sinkt, die Zellzahl aber konstant bleibt, scheidet auch eine erleichterte Diffusion aus, die zwar einen Rezeptor benötigt, im Gegensatz zu einem aktiven Transport jedoch nicht energieabhängig ist.

Die Transportstudien mit anderen Siderophoren bestätigten die Ergebnisse der Plattendiffusionstests. Kein Tranport von Fe-Aerobactin oder Fe-RA konnte nachgewiesen werden. Das Citratsystem, das bei den Plattendiffusionstests nachgewiesen werden konnte, zeigte nur geringe Aufnahmeraten des Fe-Citrats. Allerdings war die Menge des aufgenommenen, radioaktiven Eisens größer als die bei einem Ferrichromtransport der Alb^r Mutante OH 10.

Die Größe des Km-Werts für Ferrichrom entspricht mit 1 µM dem von E.coli

Bei dem Versuch eine kompetitive Hemmung zu erzeugen, fiel auf, daß zwar Ferrioxamin B und enantio-Ferrichrom schon bei niedrigen Konzentrationen eine Absenkung der Transportrate bedingen, für Coprogen jedoch wurden viel größere Konzentration benötigt, um das gleiche Ausmaß zu erreichen. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte sein, daß das Coprogen eine viel geringere Affinität zu dem Rezeptor besitzt als z.B. das Ferrichrom. Zum zweiten könnte es sich um 2 völlig unabhängige Transportsysteme handeln. Die dritte Alternative wäre ein Transportsystem, welches unterschiedliche Bindungsstellen für Ferrichrom und Coprogen besitzt. Die erste These konnte einmal dadurch widerlegt werden, daß ^{14}C -markiertes Coprogen die gleiche Transportrate wie das Ferrichrom aufwies. Zum anderen wurden Plattendiffusionstests so durchgeführt, daß bei einer EDDA Konzentration von 5 mM sinkende Konzentrationen beider Siderophore angeboten und die Grenze ermittelt wurde, bei der der eine oder andere Siderophor keinen Wachtumshof mehr hervorrief. Diese Grenze lag bei beiden Siderophoren bei 5 µM, so daß auch hier kein Unterschied festzustellen war. In einem anderen Versuch wurde gezeigt, daß die Aufhebung der antibiotischen Aktivität von Albomycin durch Ferrichrom bzw. Coprogen ebenfalls bei der gleichen Konzentration nicht mehr nachzuweisen war.

Die zweite These konnte mit Mutanten widerlegt werden. Bei unabhängigen Transportsystemen müßte man Mutanten isolieren können, bei denen nur ein System defekt ist. Diese Mutanten müßten sich dadurch auszeichnen, daß sie z.B. mit Ferrichrom nicht mehr, mit Coprogen aber noch wachsen können. Alle ca. 500 daraufhin untersuchten Mutanten wuchen aber entweder mit beiden oder aber mit keinem Hydroxamat.

So bleibt nur die Erklärung, daß das Coprogen eine andere Bindungsstelle benutzt wie das Ferrichrom, wobei die Affinität des Coprogens zu dieser Bindungsstelle allerdings geringer ausfallen muß als die des Ferrichroms. Nur so läßt sich die Tatsache erklären, daß bei den Studien der Hemmung des Ferrichromtransports so hohe Konzentrationen an Coprogen benötigt werden, um die Transportrate zu senken.

Um nachzuweisen, daß das Ferrichrom durch das Coprogen innerhalb der Zelle ersetzt werden kann, wurden die Pulse-Chase Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß das Coprogen tatsächlich in der Lage ist, das Ferrichromeisen nach dessen Aufnahme in die Zelle wieder zu entfernen.

KAPITEL 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ein eisenlimitiertes Wachstum zeigte der Wildtyp 346 in NBE (30 mM EDDA). Um Mutanten zu isolieren, die in diesem Medium nicht mehr wachsen können, wurden Alb^r und MNNG Mutanten isoliert. Die Alb^r Mutante OH 10 wuchs unter Eisenmangel genauso gut wie der Wildtyp 346. Auch in NB-Desferrioxamin Medium wuchs die Mutante ähnlich wie der Wildtyp. So kann davon ausgegangen werden, daß noch ein weiteres Eisentransportsystem bei S.aureus vorhanden ist. Die MNNG Mutanten OH 15 und OH 20 wuchsen nicht in NBE (30 mM EDDA), zeigten allerdings auch in TY und NB ein deutlich schlechteres Wachstum als der Wildtyp 346. Insofern könnten diese Mutanten auch generelle Stoffwechselmutanten darstellen. Es konnte auch kein Siderophor identifiziert werden, das von S.aureus gebildet wird.

Über das Ferrichromaufnahmesystem von S.aureus werden fast ohne Ausnahme alle angebotenen Hydroxamate aufgenommen. Allerdings werden Aerobactin und RA nicht aufgenommen. Dies ist insofern erstaunlich, da die getesteten Hydroxamate, mit denen eine Wachstumsstimulierung erfolgte, unterschiedliche chemische Strukturen besitzen. Zwar sind allen eine oder mehrere Hydroxamsäurereste gemein, das Ferrichrom aber besitzt z.B. eine ringförmige Struktur, Ferrioxamin B dagegen ist ein offenkettiges Molekül. Weiterhin besitzen Ferrichrom eine -cis, Coprogen dagegen eine -trans Konfiguration um das Eisenzentrum. Neben dem basischen Desferrioxamin B werden auch die neutralen Desferrioxamine D1 und E aufgenommen, bzw. zeigen eine Wachstumsstimulierung in NBE (5 mM EDDA). Das Transportsystem scheint keine stereospezifische Erkennungsregion zu besitzen (enantio-FC wie FC werden transportiert). Auch geladene (Ferrichrom A) und ungeladene Siderophore (Ferrichrom) erzeugen eine Wachstumsstimulierung, so daß aufgrund der Ladung auch nicht unterschieden wird, welches Siderophor transportiert wird und welches nicht. Allerdings kann allein die Tatsache, daß alle Chelatoren Hydroxamsäurereste besitzen auch nicht das Kriterium für die Aufnahme sein, da Aerobactin und RA nicht aufgenommen werden. Das zum Ferrichrom strukturanaloge Antibioticum Albomycin sowie das zum Ferrioxamin B strukturanaloge Ferrimycin benutzen dasselbe Transportsystem wie die Hydroxamate (Alle Alb^r Mutanten waren $Ferrimycin^r$).

Der Km-Wert für das Ferrichrom beträgt 1 µM. Für das Coprogen muß postuliert werden, daß es eine andere Erkennungsstelle besitzt als das Ferrichrom, jedoch das gleiche Transportsystem benutzt.

Die Aufnahme von Fe-Citrat ist zwar uneffizienter als die des Ferrichroms, allerdings ist dieses Transportsystem unabhängig vom Ferrichromaufnahmesystem, da auch die Alb^r Mutante OH 10 Fe-Citrat transportiert.

So lassen sich mindestens 3 Eisentransportsysteme identifizieren. Neben dem Ferrichrom- und dem

Fe-Citrataufnahmesystem muß es noch ein drittes, spezifisches Eisentransportsystem geben, über das sich z.B. die Alb^r Mutante OH 10 mit Eisen versorgen kann.

KAPITEL 6. LITERATUR

1. Aasa R., B.G.Malmström, P.Saltman and T.Vängärd. 1963. The specific binding of iron (III) and copper (II) to transferrin and conalbumin. Biochim.Biophys. Acta 75: 203-222.
2. Aisen P. and A.Leibman. 1972. Lactoferrin and Transferrin: a comparative study. Biochim.Biophys. Acta 257: 314-323.
3. Archibald, F. 1983. Lactobacillus plantarum, an organism not requiring iron. FEMS Micobiol.Lett. 19: 29-32.
4. Arnold R.R., M.F.Cole and J.R.McGhee. 1977. A bactericidal effect for human lactoferrin. Science 197: 263-265.
5. Arnow, L.E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4 dihydroxyphenylalanine tyrosine mixture. J.Biol.Chem. 118: 531-537.
6. Asbeck B.S. et al. 1983. Effect of Deferoxamine on bacterial growth. Eur.J.Clin.Microbiol. 2: 428-431
7. Becker, J.O.,E.Messens and R.W.Hedges. 1985. The influence of agrobactin on the uptake of ferric iron by plants. FEMS Microbiol.Lett. 31: 171-175.
8. Bindereif, A. and J.B.Neilands. 1985. Aerobactin genes in clinical isolates of Escherichia coli J.Bacteriol. 161: 727-735.
9. Braun, V. 1981. Eisenversorgung und Virulenz bei

Escherichia coli .Forum Mikrobiol. 2: 69-72.

10. Braun, V., R.Burkhardt, R.Schneider, L.Zimmermann. 1982. Chromosomal genes for ColV plasmid-determined Fe^{3+}-aerobactin transport in *Escherichia coli* J.Bacteriol. 152: 553-559.

11. Braun, V., K.Schaller und H.Wolff. 1973. A common receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of *Escherichia coli B* .Biochim. Biophys.Acta 323: 87-97.

12. Brock, J.H. and J.Ng. 1983. The effect of desferrioxamine on the growth of *Staphylococcus aureus* , *Yersinia enterolytica* and *Streptococcus faecalis* in human serum: uptake of desferrioxamine-bound iron. FEMS Microbiol.Lett. 20: 439-442.

13. Bullen, J.J. and T.A.Armstrong. 1979. The role of Lactoferrin in bactericidal funktion of polymorphnuclear leucocytes. Immunology 36: 781-791.

14. Bullen,J.J., H.J.Rogers and E.Griffiths. 1974. Bacterial iron metabolism in infection and immunity. In: J.B.Neilands (ed). Microbial iron metabolism. Acad. Press, New York. pp.518-552.

15. Carter, P. 1971. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). Anal.Biochem. 40: 450-458.

16. Corbin, J.L. and W.A. Bullen. 1969. The isolation and identification of 2,3 Dihydroxybenzoic acid and 2-N, 6-N Di(2,3 Dihydroxybenzoyl)-L-Lysine formed by iron deficient *Azotobacter vinelandii* Biochemistry 8: 757-762.

17. Csáky, T.Z. 1948. On the estimation of bound hydroxylamine. in biological materials. Acta Chem.Scand. 2: 450-454.

18. Dubach,R., S.T.E.Callender and C.V.Moore. 1948. Studies in iron transportation and metabolism VI. Absorbtion of radioactive iron in patients with fever and with anemias of varied etiology. Blood 3: 526-542.

19. Evanylo, L.P., S.Kadis and J.R.Maudsley. 1984. Siderophore production by Proteus mirabilis . Can.J.Microbiol. 30: 1046-1051.

20. Fecker, L. and V.Braun. 1983. Cloning and expression of the fhu genes involved in the iron(III) hydroxamate uptake by Escherichia coli . J.Bacteriol. 156: 1301-1314.

21. Frost, G. and H.Rosenberg. 1975. Relationships between the tonB locus and iron transport in Escherichia coli .J.Bacteriol. 124: 704-712.

22. Frost, G.E. and H.Rosenberg. 1973. The inducible citrate-dependent iron transport system in Escherichia coli K12. Biochim.Biophys.Acta 330:90-10..

23. Gibson, F. and D.I.Magrath. 1969. The Isolation and characterisation of a hydroxamaic acid (aerobactin) formed by Aerobacter aerogenes 62-1. Biochim.Biophys. Acta 192: 175-184.

24. Griffiths, E. 1983. Availability of iron and survival of bacteria in infection. In: Easmon,C.S.F. and J.Jeljaszewicz (eds). Medical microbiology, V. 3. Role of the envelope in the survival of bacteria in infection. Acad.Press, London. pp.153-17?

25. Griffiths, E., H.J.Rogers and J.J.Bullen. 1980. Iron, plasmids and infection. Nature (London) 284: 508-509.

26. Hancock, R.E.W., K.Hantke, V.Braun. 1976. Iron transport in Escherichia coli K12: Involvement of the colicin B receptor and of a citrate-inducible protein. J.Bacteriol. 127: 1370-1375.

27. Hantke, K. 1984. Cloning of the repressor protein gene of iron regulated systems in Escherichia coli K12. Mol.Gen.Genet. 197: 337-341.

28. Hantke, K. 1983. Identification of an iron uptake system specific for Coprogen and rhodutorulic acid in Escherichia coli K12. Mol.Gen.Genet. 191: 301-306.

29. Hantke, K. 1981. Regulation of ferric iron transport in Escherichia coli K12: involvement of a constitutive mutant. Mol.Gen.Genet. 182: 288-292.

30. Hantke, K. and L.Zimmermann. 1981. The importance of the exbB gene for vitamin B12 and ferric iron transport. FEMS Microbiol.Lett. 12: 31-35.

31. Harman R.J.,F.L.Schanbacher, L.C.Ferguson and K.L.Smith. 1976. Changes in lactoferrin immunoglobulin G, bovine serum albumin, and a lactoalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. Infect.Immun. 13: 533-542.

32. Hartmann, A.,H.-P. Fiedler and V.Braun. 1979. Uptake and conversion of the antibiotic albomycin by Escherichia coli K12. Eur.J.Biochem. 99: 517-524.

33. Hill R., I.M.Smith, H.Mahammdai andS.T.Licence. 1977. Altered absorbtion and regulation of iron in chicks with acute Salmonella gallinarum infection. Res. Veterin.Science 22: 371-375.

34. Hulcher, F.H. 1982. Isolation and Characterisation of a new hydroxamic acid from Pseudomonas mildenbergii Biochem. 21: 4491-4495.

35. King R.D., H.A.Khan, J.C.Foye, J.H.Greenberg and H.E. Jones. 1975. Transferrin iron and dermatophytes. J.Lab.Clin.Med. 86: 204-212.

36. Kluger M.J. and B.A.Rothembug. 1979. Fever and reduced iron: their interaction as a host defence response to bacterial infection. Science 203: 374-376.

37. Letendre, E.D. and W.A.Gibbons. 1985. Isolation and purification of canaphore, a siderophore produced by Helminthosporium carbonium .Biochem.Biophys.Res.Com. 129: 262-267.

38. Luke, R.K.J. and F.Gibson. 1971. Location of three genes concernes with the conversion of 2,3-dihydroxybenzoate into enterochelin in Escherichia coli K12. J.Bacteriol. 107: 557-562.

39. Marcelis, J.H., H.J.den Daas-Slagt and J.A.A.Hoogkamp-Korstanje 1978. Iron requirement and chelator production of staphylococci, Streptococcus faecalis and enterobacteriaceae. Ant.v. Leeuvenh. 44: 257-267.

40. Marshall, J.H. and G.J.Wilmoth. 1981. Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotinoids. J.Bacteriol. 146: 900-913.

41. Maskell, J.P. 1980. The functional interchangeability of enterobacterial and staphylococcal iron chelators. Ant.v.Leeuvenh. 46: 343-351.

42. Masson, P.L. and J.F.Heremans. 1966. Studies on lactoferrin, the iron-binding protein of secretions. In: Protides of the biological fluids 14, Elsevier Publishing Company, Amsterdam. pp 268-270.

43. McIntosh, M.A. 1983. Genetics of a ferric enterobactin transport in *Escherichia coli*. In: Schlessinger, D. (ed). Microbiology 1983. Am.Soc.Microbiol., Washington D.C. pp.296-300.

44. Modi, M., K.S.Shah and V.V.Modi. 1985. Isolation and characterisation of catechol like siderophore from cowpea *Rhizobium* RA-1. Arch.Microbiol. 14: 156-158.

45. Morita, T., J.E.Patterson and M.J.Woodburn. 1979. Magnesium and iron addition to casein hydrolysate medium for production of staphylococcal enterotoxins A,B and C. Appl.Env.Microbiol. 38: 39-42.

46. Müller, A. and H.Zähner. 1968. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Ferrioxamine aus Eubacteriales. Arch.Microbiol. 62: 257-263

47. Neilands, J.B. 1974. In: Microbial Iron metabolism. Neilands, J.B. (ed). Acad.Press, N.Y. and London.

48. Norrod, P. and R.P.Williams. 1978. Growth of *Neisseria*

gonorrhoeae in media deficient in iron without detection of Siderophores. Current Microbiol. 1: 281-284.

49. O'Brien, I.G. and F.Gibson. 1970 . The structure of entrerochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli* Biochim.Biophys.Acta. 215: 393-402.

50. Ong, S.A., T. Peterson and J.B. Neilands. 1979. Agrobactin, a Siderophore from *Agrobacterium tumefaciens* .J.Biol.Chem. 254: 1860-1865.

51. Payne, S.M. 1983. Siderophores and acquisition of iron by gram-negativ pathogens. In: Schlesinger, D. (ed). Microbiology 1983. Am.Soc.Microbiol.,Washington D.C. pp.346-349.

52. Payne, S.M. et al. 1983. Expression of Hydroxamate and Phenolate Siderophores by *Shigella flexneri* J.Bacteriol. 155: 949-955.

53. Perry, R.D. and C.L. San Clemente. 1979. Siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae* and *Shigella sonnei* during iron deficiency. J.Bacteriol. 140: 1129-1132.

54. Philson, S.B. and M.Llinás. 1982, Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens* .J.Biol.Chem. 257: 8081-8085.

55. Pierce, J.R., C.L.Pickett, C.F.Earhart. 1983. Two *fep* genes are required for ferrienterochelin uptake in *Escherichia coli* K12. J.Bacteriol. 155: 330-336.

56. Pollack, J.R. and J.B. Neilands. 1970. Enterobactin,

an iron transport compound from Salmonella typhimurium .Biochem.Biophys.Res.Commun. 38: 989-992.

57. Raymond, K.N. and C.J. Carrano. 1979. Accounts Chem.Res. 12: 183-190.

58. Reeves, M.W., L.Pine, J.B.Neilands and A.Balows. 1983. Absence of Siderophore activity in Legionella species grown in iron deficient media. J.Bacteriol. 154: 324-329.

59. Repine, J.E., R.B.Fox, E.M.Berger and R.N.Harada. 1981. Effect of staphylococcal iron content on the killing of Staphylococcus aureus by polymorphnuclear leucocytes. Infect.Immun. 32: 407-410.

60. Repine, J.E., R.B.Fox and E.M.Berger. 1981. Hydrogen peroxide kills Staphylococcus aureus by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. J.Biol.Chem. 256: 7094-7096.

61. Rogers, H.J. 1973. Iron-binding catechols and virulence in Escherichia coli .Infec.Immun. 7: 445-456.

62. Rogolsky, M. 1979. Nonenteric Toxins of Staphylococcus aureus .Microbiological Reviews 3: 320-360.

63. Schade, A.L. and L.Caroline. 1944. Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of Salmonella dysenteriae , Staphylococcus aureus , Escherichia coli and Saccharomyces cerevesiae. Science. 100: 14

64. Schade, A.L. and L.Caroline. 1946. An iron binding component in human plasma. Science, 104: 340

65. Schade, A.L. 1963. Significance of serum iron for the

growth, biological characteristics and metabolism of Staphylococcus aureus .Biochem.Z. 338: 140-148.

66. Schade, A.L. 1974. Growth of Staphylococcus aureus as controlled by the percentage of iron saturation of the ekkrinosiderophilin (Lactoferrin) of human milk.

67. Schneider,H.A. 1967. Ecological ectocrines in experimental epidemiology. Science 158: 597-603

68. Schneider, R., A.Hartmann and V.Braun. 1981. Transport of the iron ionophor ferrichrome in Escherichia coli K12 and Salmonella thyphymurium LT2. FEMS Microbiol.Lett. 11: 115-119.

69. Snow, G.A. 1970. Bacteriol.Rev. 34: 99-125

70. Stookey, L.L. 1970. Ferrozine - a new spectrophotometric Reagent for iron. Anal.Chem. 42: 779-781.

71. Stuart, S.J., K.T.Greenwood and R.K.J. Luke. 1980. Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by ColV plasmids. J.Bacteriol. 143: 35-42.

72. Tait, G.H. 1975. The Identification and Biosynthesis of Siderochromes formed by Micrococcus denitrificans .Biochem.J. 146: 191-204.

73. Theodore, T.S. and A.L.Schade. 1965. Growth of Staphylococcus aureus in media of restricted and unrestricted inorganic iron availability. J.Gen.Microbiol. 39: 75-83.

74. Valenti, P. et al. 1981. Influence of bicarbonate and

citrate on the bacteriostatic action of ovotransferrin towards staphylococci. FEMS Microbiol.Lett. 10: 77-79.

75. Valenti, P. et al. 1980. Capacity of Staphylococci to grow in the presence of ovotransferrin or $CrCl_3$ as a character of potential pathogenity. J.Clin. Microbiol. 11: 445-447.

76. Waggeg, W. and V.Braun. 1981. Ferric citrate transport in Escherichia coli requires outer membran protein FecA. J.Bacteriol. 145: 156-163.

77. Wawszkiewicz, E.J. 1974. Riddle of the Pacifarins. In Microbiology-1974 III. Roles of Iron in Host-Parasite Interactions. 299-305.

78. Wayne, R. and J.B.Neilands. 1975. Evidence for common binding sites for ferrichrome compounds and bacteriophage Ø80 in the cell envelope of Escherichia coli .J.Bacteriol. 121: 497-503.

79. Wayne, R., K.Frick and J.B.Neilands. 1976. Siderophore protection against colicine M,B,V and Ia in Escherichia coli .J.Bacteriol. 126: 7-12.

80. Weinberg, E.D. 1978. Iron and infection. Microbiol. Rev. 42: 45-66.

81. Williams, P.H. and P.J.Warner. 1980. ColV plasmid-mediated, colicin V independent iron uptake system of invasive strains of Escherichia coli Infect. Immnun. 29: 411-416.

82. Williams, P.H. 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of Escherichia coli

Infect.Immun. 26: 925-932.

83. *Wiseman G.W. 1975. The hemolysins of Staphylococcus aureus .Bacteriological reviews 39: 317-344.*

84. *Woodrow, G.C., I.G.Young, F.Gibson. 1975. Mu-induced polarity in the Escherichia coli K12 ent gene cluster: evidence for a gene (entG) involved in the biosythesis of enterochelin. J.Bacteriol. 124:1-6.*

85. *Wookey, P., S.Hussein and V.Braun. 1981. Functions in outer and inner membrane of Escherichia coli for ferrichrome transport. J.Bacteriol. 146: 1158-1161.*

86. *Wookey, P. and H.Rosenberg. 1978. Involvement of inner and outer membrane components in the transport of iron and in colicin B action in Escherichia coli J.Bacteriol. 133: 661-666.*

87. *Yancey, R.J. and R.A.Finkelstein. 1981. Assimilation of iron by pathogenic Neisseria spp. Infec.Immun. 32: 592-599.*

88. *Yancey, R.J. and R.A.Finkelstein. 1981. Siderophore production by pathogenic Neisseria spp. Infec.Immun. 32: 600-608.*

89. *Yancey, R.J. and R.A.Finkelstein. 1981. Effect of Siderophores on virulence of Neisseria spp. Infec.Immun. 32: 609-613.*

90. *Young, I.G., L.Langman, R.K.J. Luke, F.Gibson. 1971. Mutants of Escherichia coli unable to sythezise 2,3-dihydroxybenzoate. J.Bacteriol. 106: 51-57.*

91. *Zähner H. 1962. Sideramine, eisenhaltige Wachstumsfak-*

toren aus Mikroorganismen. Path.Microbiol. 25: 708-736.

Lebenslauf

Bernhard Ohme

8.März 1956	geboren in Böblingen
1963 - 1967	Grundschule Böblingen
1967 - 1977	Max-Planck Gymnasium Böblingen Abschluß: Abitur
1977 - 1978	Wehrdienst
ab WS 1978/1979	Biologie-Studium an der Universität Tübingen
ss 1980	Diplomvorprüfungen
WS 1982/1983	Mündliche Diplomhauptprüfungen
1.4.83 bis 31.10.83	Diplomarbeit, Thema: Untersuchungen einer eisensensitiven Mutante von E.coli K12
ab 1.11.1983	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II an der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. V.Braun und Privatdozent Dr. K.Hantke.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, FW. Bentrup, W. Bessler, V. Braun,

W. Frey, KG.Grell, KP. Hadeler, K. Hantke, F. Oberwinkler,

H. Probst, W. Rähle, A.Rieker, B. Schwemmle, U. Seitz,

W. Seyffert, D. Sperlich, J. Strähle, G. Winkelmann, K. Wöhrmann,

H. Zähner.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45